

Univerzita Karlova v Praze
Pedagogická fakulta
Katedra chemie a didaktiky chemie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Izolace a hmotnostní charakterizace chlorofylu
Isolation and mass characterisation of chlorophyll
Markéta Švárová

Vedoucí práce: Mgr. Ing. Štěpánka Hrdličková Kučková, Ph.D.
Studijní program: Specializace v pedagogice
Studijní obor: Chemie – Matematika

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Izolace a hmotnostní charakterizace chlorofylu vypracovala pod vedením vedoucího práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále prohlašuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Praha 9. 4. 2015

.....

podpis

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí bakalářské práce, paní Mgr. Ing. Štěpánce Hrdličkové Kučkové, Ph.D., za její odborné vedení, čas, trpělivost a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat paním laborantkám, Anně Rážové a Janě Fiřtové, za pomoc a čas, který jsem mohla strávit v laboratořích Katedry chemie a didaktiky chemie na Pedagogické fakultě Univerzity Karlovy v Praze.

ANOTACE

Tato bakalářská práce pojednává o izolaci a hmotnostní charakterizaci rostlinných barviv, která jsou obsažena v zelených částech rostlin. Barviva byla izolována pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC – Thin Layer Chromatography) z listů jetele lučního (*Trifolium pratense*) a javoru mléče (*Acer platanoides*). Získané různé typy chlorofylů a karotenoidů byly dále studovány infračervenou spektroskopií FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) a hmotnostně charakterizovány hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization – Time of Flight).

KLÍČOVÁ SLOVA

rostlinná barviva, chlorofyl, infračervená spektroskopie, izolace, tenkovrstvá chromatografie, hmotnostní spektrometrie

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with an isolation and mass characterisation of vegetal dyes, which are contained in plant green parts. The dyes were isolated by TLC – Thin Layer Chromatography, from the leaves of red clover (*Trifolium pratense*), and Norway maple (*Acer platanoides*). Afterwards, the obtained various chlorophyll and carotenoid dyes were studied by infrared spectroscopy FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy), and characterised by mass spectrometry MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization – Time of Flight).

KEYWORDS

vegetal dyes, chlorophyll, infrared spectroscopy, isolation, thin layer chromatography, mass spectrometry

Obsah

1 Úvod.....	7
2 Teoretická část	8
2.1 Rostlinná barviva	8
2.1.1 Chlorofyly	10
2.1.2 Karotenoidy	27
2.2 Analytické metody používané pro identifikaci rostlinných barviv.....	30
2.2.1 Chromatografické metody	30
2.2.2 Infračervená spektroskopie	35
2.2.3 Hmotnostní spektrometrie.....	40
3 Experimentální část.....	48
3.1 Použité chemikálie a materiál	48
3.2 Identifikace rostlinných barviv metodou tenkovrstvé chromatografie	49
3.2.1 Extrakce listových barviv acetonem	49
3.2.2 Dělení listových barviv na tenké vrstvě Silufol.....	49
3.3 Charakterizace listových barviv metodou infračervené spektroskopie	50
3.4 Hmotnostní charakterizace oddělených listových barviv metodou MALDI-TOF MS.....	50
4 Výsledky a diskuze	53
4.1 Izolace listových barviv metodou TLC	53
4.2 Charakterizace chlorofylu <i>a</i> metodou infračervené spektroskopie FTIR.....	55
4.3 Charakterizace barviv metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF	56
4.3.1 Měření I.....	57
4.3.2 Měření II	59
4.3.3 Měření III.....	62
4.3.4 Měření IV.....	62
5 Závěr	73
6 Seznam použitých informačních zdrojů	75
7 Seznam použitých zkratk	79

1 Úvod

Cílem této bakalářské práce bylo izolovat různé typy chlorofylů pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC – Thin Layer Chromatography) a následně zjistit jejich molekulové hmotnosti metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization – Time of Flight). Jako vhodný materiál k získání rostlinných barviv byly vybrány zelené listy jetele lučního (*Trifolium pratense*). Tato práce se zabývá nejen chlorofyly, ale i další skupinou rostlinných barviv, kterými jsou karotenoidy, protože se vyskytují spolu s chlorofylem v zelených částech rostlin. Tato barviva je možné nalézt především na podzim ve zbarvujících se listech, a proto byla extrahována i z listů stromu javoru mléče (*Acer platanoides*), které byly zbarveny dožluta až červená.

V této bakalářské práci je zahrnut i pokus o charakterizaci chlorofylu pomocí infračervené spektroskopie FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy). Před analýzou byla jednotlivá barviva opět separována pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC).

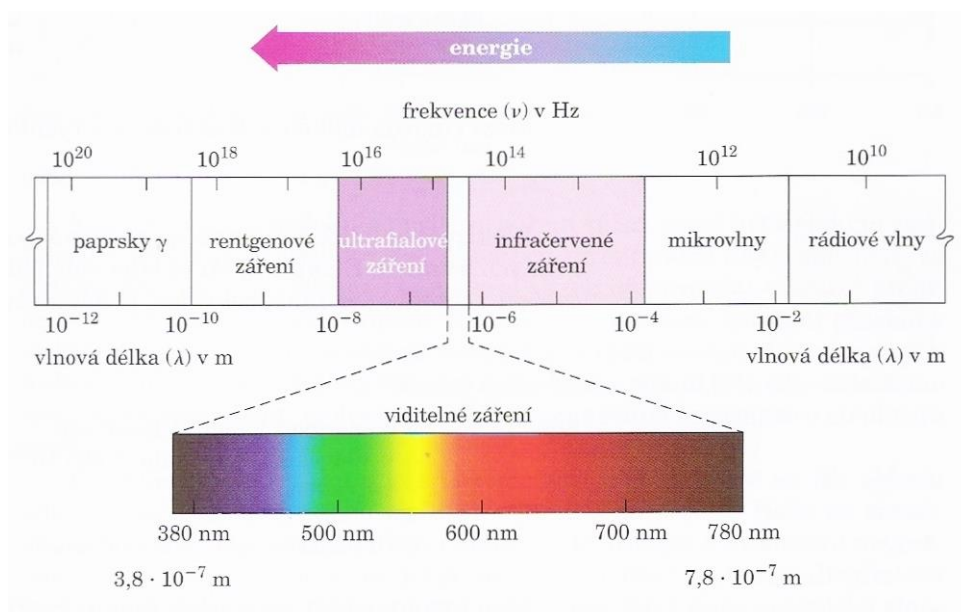
2 Teoretická část

2.1 Rostlinná barviva

Světlo je elektromagnetické záření, které se pohybuje konstantní rychlostí a šíří se v pravidelných vlnách podobných těm, které vznikají na hladině rybníka, když se do něj hodí kámen. To ale neznamena, že by se elektromagnetické vlny vytvářely v hmotném prostředí; jsou „vzruchem“ v elektrických a magnetických polích. Elektromagnetickou vlnu popisují tři veličiny: vlnová délka, frekvence a amplituda. Vlnová délka (λ , lambda) je vzdálenost mezi dvěma po sobě jdoucími vrcholy jedné vlny a většinou se vyjadřuje jednotkou nanometr (nm). Frekvence (kmitočet, ν) udává počet vlnových maxim, která projdou určitým bodem za časovou jednotku. Jednotkou frekvence je hertz (Hz, $1 \text{ Hz} = 1 \text{ s}^{-1}$), tj. počet cyklů za sekundu. Amplituda je výška vlny, měřená od středu vlny k maximu. Součin vlnové délky a frekvence udává rychlost šíření vlny v metrech za sekundu (rovnice 1). Rychlost elektromagnetického záření ve vakuu se nazývá rychlost světla a značí se c . Přibližná hodnota je $3 \cdot 10^8 \text{ m s}^{-1}$.

$$c = \nu \lambda \quad \text{Rovnice} \quad 1.$$

Jednotlivé typy záření se liší vlnovou délkou, vzdáleností jednoho maxima vlny ke druhému, a proto vytváří rozsah záření známé jako elektromagnetické spektrum (obr. 1). Již Isaac Newton zjistil, že viditelné světlo lze rozdělit do spektra průchodem světla přes hranol. Viditelné světlo, spektrum připomínající duhu, má vlnovou délku v rozmezí 380 nm (na modrém konci) až 780 nm (na červeném konci). Sluneční záření je tvořeno nehmotnými částicemi, nazývanými fotony, které nesou určité množství energie. Toto množství energie je nepřímo úměrné vlnové délce světla; čím je vlnová délka kratší, tím více energie nese každý z fotonů tohoto světla [1]. V dnešní době se vyskytuje mnoho druhů spektroskopických metod a každá z nich využívá jiný rozsah vlnové délky elektromagnetického záření. Záření různých frekvencí ovlivňuje molekuly různým způsobem, a pokud tyto děje dokážeme správně interpretovat, mohou nám poskytnout cenné informace o struktuře látek [2]. Světlo má vliv na růst a vývoj živých organismů. Ale aby na něj mohly reagovat, musí obsahovat fotoreceptory. [1-4]



Obrázek 1. Elektromagnetické spektrum s rozšířenou částí viditelného světla, kterou lidské oko rozeznává jako různé barvy. [2]

Barviva (pigmenty) patří mezi sekundární metabolity. Důvodem jejich zbarvení je, že pohlcují vybrané složky viditelného světla. Jejich barva je pak komplementární k pohlceným složkám záření (tabulka I). Když na barvivo posvítíme bílým světlem, uvidíme barvu, kterou barvivo nejvíce odráží nebo propouští (například pigment, který absorbuje světlo ve všech vlnových délkách, se projevuje černou barvou). Ve zrakovém ústrojí vznikají příslušné barevné vjemy vyvolané zářením, kterým se říká doplňkové barvy (tabulka I). Vytváří se spojením nepohlceného záření. [1, 5]

Schopnost barviva absorbovat viditelné světlo v určitých vlnových délkách lze kvantitativně změřit pomocí spektrofotometru. Výsledek, graf zaznamenávající pohlcování světla barvivem (tj. podíl, který barvivo nepropouští, ani neodráží) v závislosti na vlnové délce, se nazývá absorpční spektrum. Vrchol křivky v grafu určuje nejvýznamnější vlnové délky pohlcovaného světla pigmentem.

Tabulka I. Přiřazení doplňkových barev ke spektrálním barvám viditelného světla. [5]

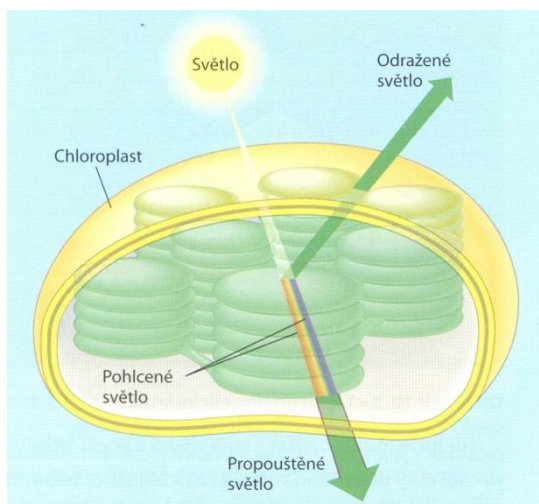
Vlnová délka (nm)	Spektrální barva	Doplňková barva
400–435	fialová	zelenožlutá
435–480	modrá	žlutá
480–490	zelenomodrá	oranžová
490–500	modrozelená	červená
500–560	zelená	purpurová
560–580	zelenožlutá	fialová
580–595	žlutá	modrá
595–605	oranžová	zelenomodrá
605–730	červená	modrozelená
730–760	purpurová	zelená

Obecně můžeme rozdělit organická barviva na syntetická a přírodní, kam patří živočišná a rostlinná barviva. K nejznámějším barvivům rostlin patří chlorofyly (oddíl 2.1.1), karotenoidy (oddíl 2.1.2), flavonoidy, anthokyaniny atd. [6]

2.1.1 Chlorofyly

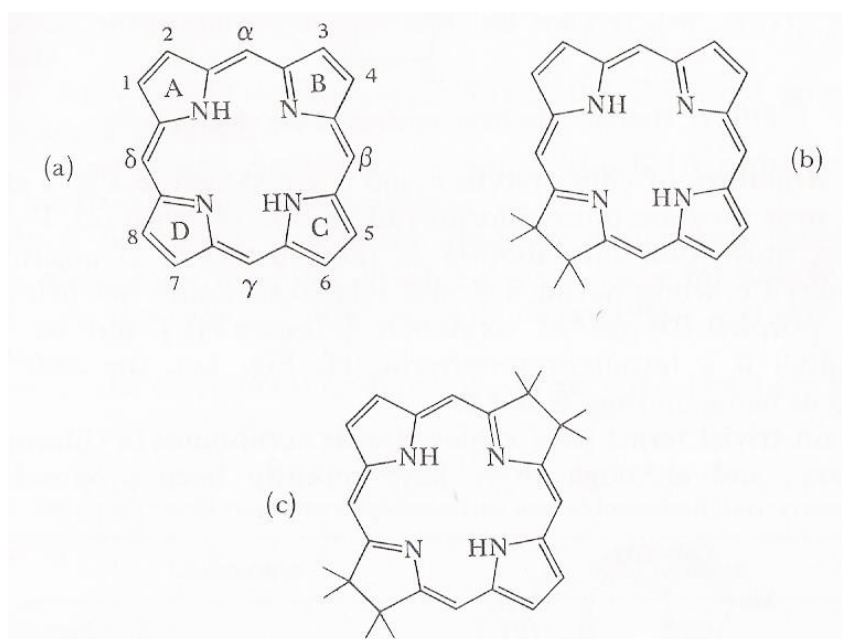
Chlorofyly jsou nejrozšířenější zelená rostlinná barviva [7], která jsou obsažena ve všech rostlinách, ve kterých probíhá fotosyntéza. Proto jsou nezbytné pro náš život na Zemi. Orgány, ve kterých se nachází chlorofyl, se nazývají chloroplasty. Tyto plastidy obsahují také karotenoidy, díky kterým lépe zachycují světlo. Pohlcením fotonu se molekula chlorofylu dostává do excitovaného stavu. Chlorofyly absorbují fotony především v modré a červené oblasti spektra, a proto vidíme rostliny jako zelené (obr. 2); vlnová délka absorpčního maxima je ovlivněna bílkovinami, na něž jsou chlorofyly vázány (tvoří tzv. pigment-proteinové komplexy) [6]. Roztok chlorofylu vybuzený ultrafialovým zářením světélkuje červenooranžovým světlem [1, 8]. Pro své blahodárné účinky můžeme přípravky obsahující zelené rostlinné extrakty a chlorofyl

najít běžně v prodeji, a to například jako přípravky na hubnutí či doplňky stravy. Vykazují také léčivé účinky, a to především protizánětlivé, antikarcinogenní a rovněž podporují hojení ran. Přestože chlorofyly patří mezi barviva, nejsou příliš vhodná pro barvení jiných materiálů, a proto se v tomto směru příliš často nepoužívají.



Obrázek 2. Vzájemný vztah světla a chlorofylu obsaženého v chloroplastech. [1]

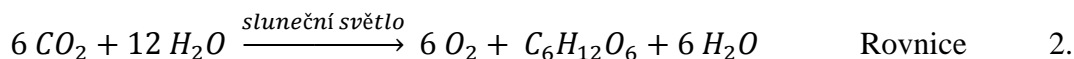
Chlorofyly patří mezi porfyrinová barviva, která mají v porfyrinovém cyklu obsažen atom hořčíku. Jsou odvozeny od porfyrinu a jeho di- a tetrahydro- derivátů (obr. 3). [9]



Obrázek 3. Struktura (a) porfyrinu, (b) dihydroporfyrinu (chlorin), (c) tetrahydroporfyrinu (bakteriochlorin). [9]

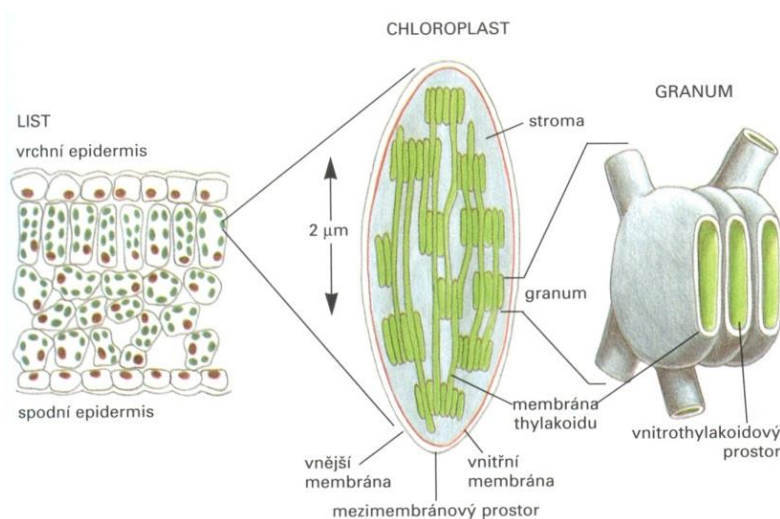
Fotosyntéza

Fotosyntéza je jeden z nejdůležitějších přírodních dějů naší planety. Pro náš život je nezbytná, neboť produkuje kyslík a zelené rostliny pomocí ní syntetizují sacharidy. Zjednodušeně: tento proces představuje přeměnu světelné energie na energii chemickou, během něj sluneční světlo poskytuje energii pro přeměnu oxidu uhličitého a vody na glukózu a kyslík (rovnice 2) [2].



Glukóza se následně přemění na škrob nebo celulózu. Voda se objevuje na obou stranách rovnice (rovnice 2), protože během fotosyntézy je 12 jejích molekul spotřebováno a 6 molekul znovu nově vytvořeno [1]. Tato souhrnná rovnice je známá již od 19. století. S fotosyntézou se můžeme setkat jak u eukaryotických organismů (vyšších rostlin, zelených a hnědých řas), tak u prokaryotických organismů (jednobuněčných sinic a některých druhů bakterií). [1, 2]

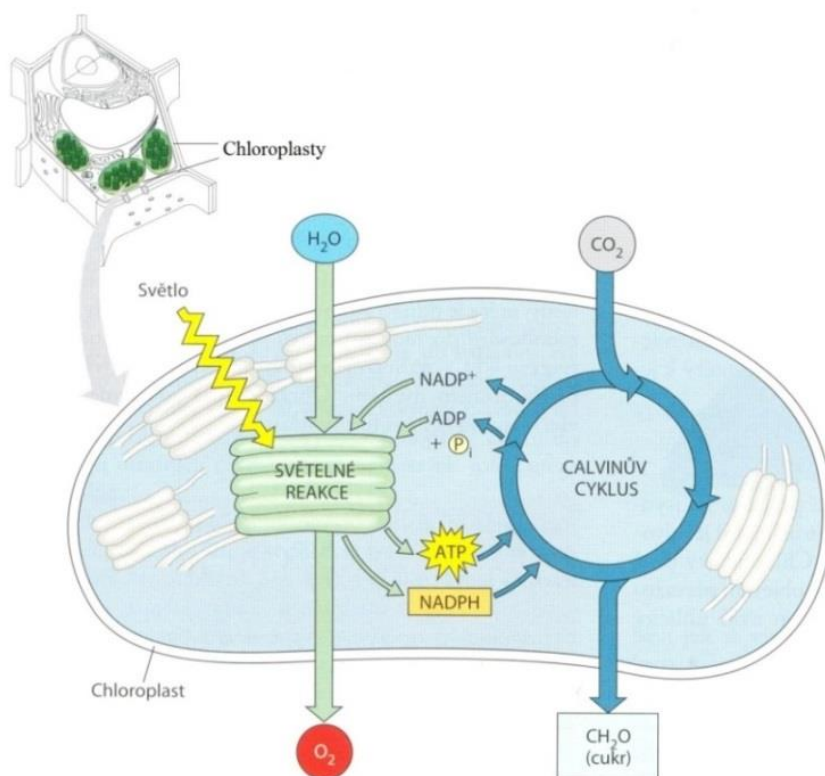
Všechny zelené části rostlin obsahují chloroplasty (obr. 4). Avšak u většiny rostlin jsou právě zelené listy hlavním sídlem fotosyntézy. Každý list pojímá velké množství chloroplastů – na jeden milimetr čtvereční povrchu listu připadá přibližně milion chloroplastů.



Obrázek 4. Schéma chloroplastu. [10]

Tato fotosyntetizující organela obsahuje tři různé membrány (vnější membránu, vnitřní membránu a membránu thylakoidů), které určují tři oddělené vnitřní oddíly (mezimembránový prostor, stroma a prostor uvnitř thylakoidu) [10]. Chloroplasty se navzájem napojují a vytváří *grana* (seskupení thylakoidů). Tím, že chlorofyl pohlcuje sluneční záření, přispívá k tvorbě organických látek v chloroplastu. [1, 10]

Fotosyntéza probíhá ve dvou souvisejících fázích, světelné a temnostní (obr. 5). Také se označují jako reakce zachycující světlo a redukční reakce uhlíku [4]. Temnostní fázi se někdy říká přímo Calvinův cyklus, či Calvin-Bensonův cyklus [1, 4]. V názvu fotosyntézy představuje světelná fáze část *foto* a temnostní fáze část *syntéza*. Tyto dvě reakce probíhají odděleně v chloroplastech. Světelná fáze probíhá v thylakoidních membránách a temnostní fáze ve stromatu (hmotě uvnitř chloroplastu), která obsahuje velké množství enzymů. [1, 11]



Obrázek 5. Zjednodušené schéma fotosyntézy: vztah mezi světelnou reakcí a Calvinovým cyklem. [1]

- **Světelná fáze** (primární děj)

Sluneční světlo je nejdůležitějším zdrojem energie pro téměř všechny živé organismy. Světelná fáze (nazývaná také „fotosyntetické reakce přenosu elektronu“ [10]) je fotochemický děj, během něhož dochází k přeměně energie fotonů slunečního záření na energii chemickou. Energie slunečního záření se změní na energii excitovaných elektronů. Používá se k výrobě adenosintrifosfátu (ATP), molekuly s vysokým obsahem chemické energie, přenosem protonů, a nikotinadenindinukleotidfosfátu (NADPH) přenosem elektronů. [12, 13] Za tuto fázi vděčíme fotosyntetizujícímu aparátu, který se skládá ze tří částí:

a) Fotoreceptory

S výjimkou některých bakterií a několika druhů řas, všechny ostatní fototrofní organismy obsahují jako zachycovače sluneční energie stejné fotoreceptory, nazývané chlorofyly, a to chlorofyl *a* a *b* [13].

b) Fotosyntetické reakční centrum

Pomocí přijatého záření zde dochází k excitaci elektronů (světelná energie na energii elektrickou). Světlo vybudí elektron na vyšší energetickou hladinu a tento energií nabitý elektron je příjemcem zachycen ještě dříve, než se stačí vrátit do svého základního stavu v molekule chlorofylu [1].

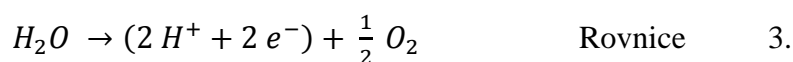
c) Řetězec oxidoreduktáz

Probíhá tu přeměna elektrické energie na energii chemickou, zároveň i výroba ATP a NADPH.

Tato fáze se skládá ze čtyř reakcí [13]:

1) Fotochemická excitace fotoreceptoru, čili chlorofylu, je reakce, při níž dochází k absorpci slunečního záření a jejímž důsledkem je přesun elektronů do excitovaného stavu.

2) Fotolýza vody (též Hillova reakce) objasňuje, jakým způsobem se voda podílí na fotosyntéze. Tuto reakci popisuje následující rovnice 3:

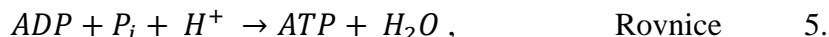


3) Fotoredukce NADP^+



Elektrony použité v této endergonické reakci nepocházejí z fotolýzy vody (ta poskytuje na redukci NADP^+ pouze 2 H^+), ale jsou to elektrony chlorofylu, které byly excitovány slunečním zářením [13].

4) Fotofosforylace (výroba ATP) probíhá podle rovnice 5:



kde P_i je označení pro anion kyseliny trihydrogenfosforečné. Proces fosforylace objasnil D. Arnon až v roce 1954 a jeho mechanismus vysvětlil P. Mitchell v roce 1961 pomocí chemiosmotické teorie [13]. Rozeznáváme dva různé typy, cyklickou a necyklickou fotofosforylací.

- **Cyklická fotofosforylace**, při níž světlem excitovaná molekula chlorofylu předává elektron do řetězce transportujícího elektrony, energie oxidačně-redukčních reakcí se využije k produkci proton-motivní síly a elektron je nakonec přenesen zpět do molekuly chlorofylu, z něhož byl na začátku oddělen [6].
- **Necyklická fotofosforylace**, při níž tok elektronů není uzavřený. Excitované elektrony jsou použity k redukci NADP^+ na NADPH a následně chlorofyl přijme elektrony především z fotolýzy vody, a tím se zregeneruje. Uvolněná energie se využije k výrobě proton-motivní síly, a dále pak k syntéze ATP. [6]

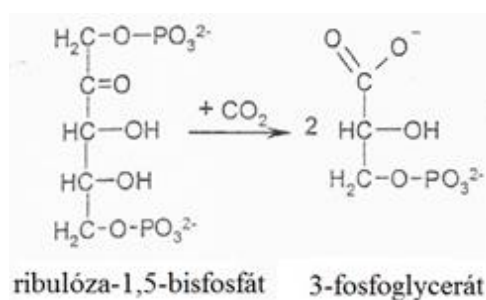
- **Temnostní fáze** (sekundární děj)

V některých publikacích je tato fáze nazývána také jako Blackman reakce [14], v jiných zase jako „redukční reakce uhlíku“ [4]. Principem je biosyntéza sacharidů z CO_2 za přítomnosti NADPH a ATP získaných ve světelné fázi fotosyntézy. Děj probíhá bez přítomnosti světla. Nejznámější metabolický proces biosyntézy sacharidů je tzv. Calvinův cyklus. Nazývá se podle objevitele M. Calvina, který tento děj popsal v roce 1930. Za výzkum asimilace oxidu uhličitého rostlinami obdržel roku 1961 Nobelovu cenu [15].

Calvinův cyklus

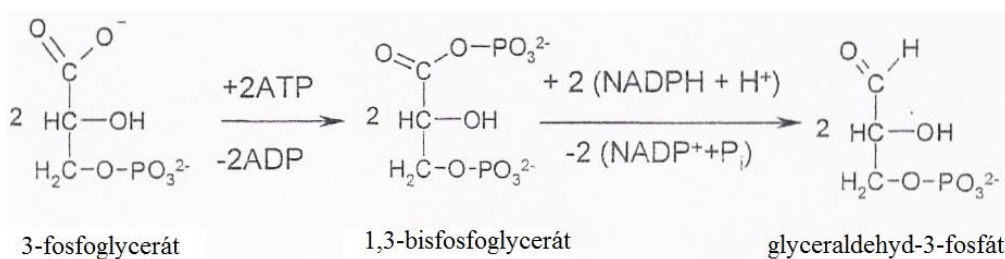
Je to hexóza-fosfátový – pentóza-fosfátový cyklický děj. Podle prvních stálých produktů asimilace, které obsahují tři atomy uhlíku, se tento cyklus nazývá také cyklus C₃ a rostliny, které fixují CO₂ pouze touto cestou, se nazývají C₃-rostliny. Proces se sestává ze tří fází [13]:

- 1) **Fixace CO₂** – připojení CO₂ na akceptor ribulóza-1,5-bisfosfát (nebo jen ribulózobisfosfát, zkráceně RuBP [1]) za vzniku nestálé sloučeniny, která se rozpadá na dvě molekuly 3-fosfoglycerátu (obr. 6). Enzym, který katalyzuje tuto reakci, se nazývá RuBP-karboxyláza, neboli rubisko. Je to protein přítomný v chloroplastu v obrovském množství a pravděpodobně nejhojnější ze všech bílkovin na Zemi [1].



Obrázek 6. Schéma reakce CO₂ a ribulóza-1,5-bisfosfátu. [6]

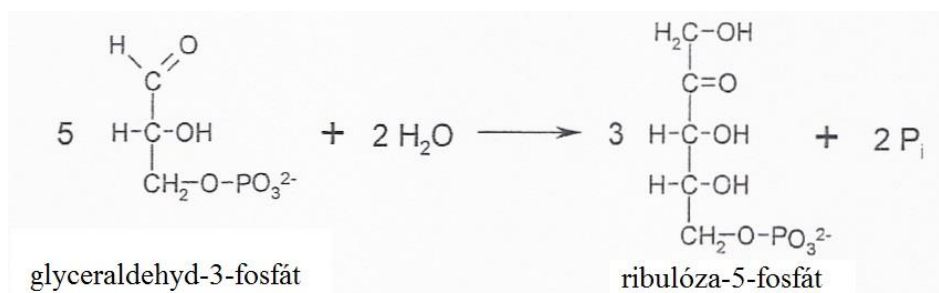
- 2) **Redukce aktivovaného CO₂** - každá molekula 3-fosfoglycerátu získává od ATP další fosfátovou skupinu a stává se 1,3-bisfosfoglycerátem. Následně je redukován dvojící elektronů dodaných NADPH na monosacharid glyceraldehyd-3-fosfát (G3P) (obr. 7). [1]



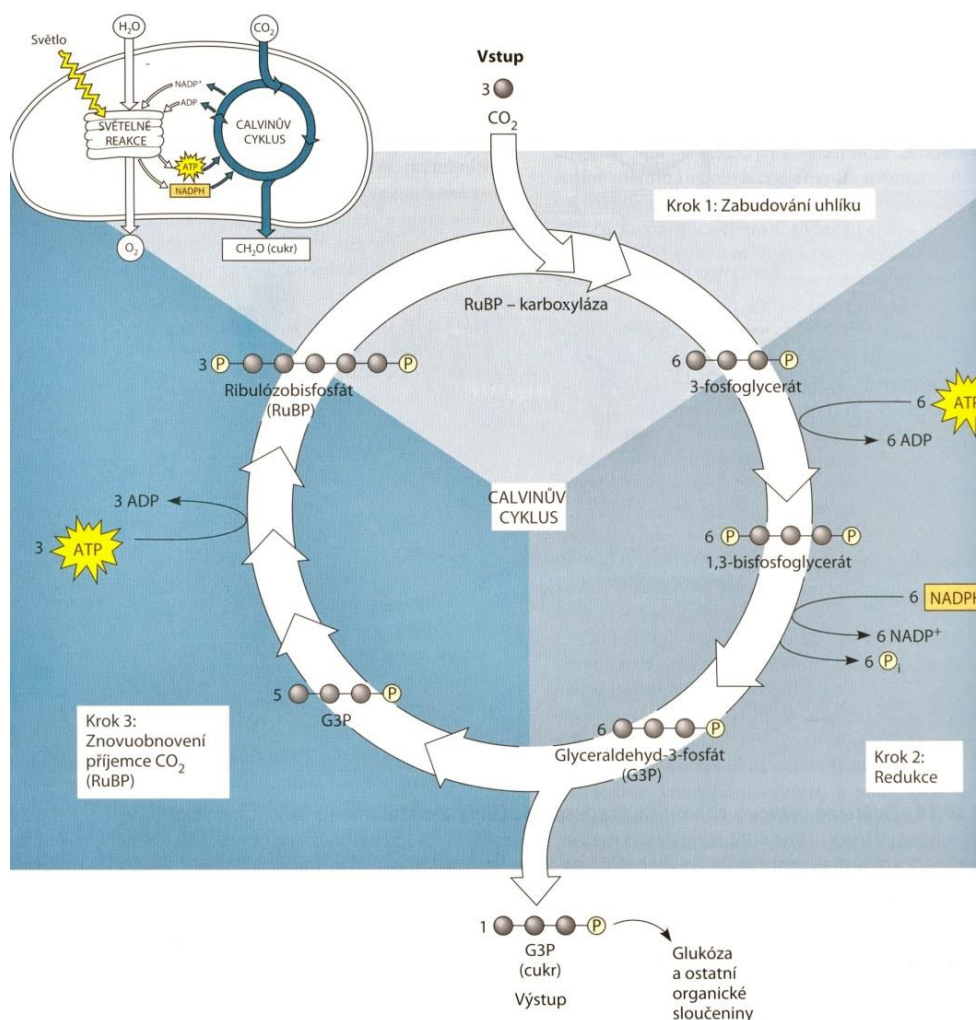
Obrázek 7. Schéma redukce 3- fosfoglycerátu za účasti NADPH a ATP. [6]

- 3) **Regenerace akceptoru CO₂** (znovuobjevení příjemce CO₂ [1]) – z molekuly glyceraldehyd-3-fosfátu vznikají procesem glukogeneze molekuly glukózy;

v prvním kroku vzniká molekula ribulóza-5-fosfátu, která je následně fosforylována pomocí ATP, čímž vzniká ribulóza-1,5-bisfosfát (obr. 8) a cyklus se uzavírá (obr. 9) [6].



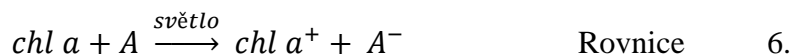
Obrázek 8. Schéma regenerační fáze za vzniku ribulóza-5-fosfátu. [6]



Obrázek 9. Schéma Calvinova cyklu. Nákres popisuje reakce uhlíkových atomů (šedých koleček) v průběhu cyklu. [1]

Existují i jiné cykly, kupříkladu **Hatchův-Slackův-Kortschackův cyklus** (cyklus C₄-rostlin), které fixují CO₂ jiným způsobem. Primárním akceptorem CO₂ je fosfoenolpyruvát a meziproduktem místo 3-fosfoglycerátu oxalacetát, který se dále přeměňuje převážně na malát nebo aspartát [13]. Vzniklé sloučeniny slouží pak k transportu navázaného CO₂ (u C₄-rostlin), nebo k jeho uložení do zásoby ve vakuolách (u CAM-rostlin) [6]. CAM-rostliny jsou pojmenovány podle způsobu zabudování uhlíku, CAM (crassulacean acid metabolism neboli kyselinový metabolismus tučnolistých), který byl poprvé objeven u rostlinné čeledi *Crassulaceae* – sukulentů [1]. Rostliny s tímto typem metabolismu (např. kukuřice, cukrová třtina, ananasovník) mohou růst i na suchých stanovištích; vyžadují však velké množství světla, neboť v temné fázi spotřebovávají více ATP než C₃-rostliny [6].

Fotosyntetické pigmenty zelených rostlin jsou součástí membránové strukturní jednotky, které se nachází ve vnitřních membránách chloroplastů (thylakoidech). Fotosystémy zachycují a dále využívají světelnou energii, a proto se jim říká kvantosomy. Každý fotosystém je tvořen světlosběrným komplexem (komplex antén) a reakčním centrem. Anténní komplex se skládá ze stovek fotosyntetických pigmentů (především chlorofylů a vedlejších pigmentů, karotenoidů). Pigmenty jsou vázané na proteiny, a proto se jim říká pigment-proteinové komplexy. Tyto komplexy přijímají energii ze slunečního záření a přenášejí ji do reakčního centra, kde je přítomen pouze chlorofyl *a*, vázaný na specifický komplex [6]. Dále se chlorofyl stává kvůli excitaci redukčním činidlem a převádí svůj elektron na molekulu příslušného přenašeče (rovnice 6) [8].



Rozlišujeme dva typy fotosystémů: **fotosystém I** (photosystem I – PS I) a **fotosystém II** (photosystem II – PS II). V PS I jsou převáděny elektrony na NADP⁺ pomocí redoxního proteinu ferredoxinu [4]. U PS II jsou elektrony odváděny z vody a oxidují se na molekulární kyslík, který se uvolňuje jako odpadní produkt [16]. V thylakoidech se nachází další dvě multi-proteinové struktury: trans-membránový cytochrom komplex (cytochrom b₆f) a ATP syntázy v chloroplastech. Vztah mezi těmito komplexy je takový, že cytochrom b₆f přijímá elektrony z PS II a posílá je do PS I. Chlorofyl *a* udává charakteristické absorpční maximum v jednotlivých fotosystémech, v PS I to je

700 nm a v PS II 680 nm. Někdy jsou označovány jako fotosystém P700 a P680. [4, 6, 8, 16]

Mnoho rostlin je schopno přijímat O_2 a uvolňovat CO_2 , tomuto ději se říká **fotorespirace** (světelné dýchání). Fotorespirace sice znamená pro rostlinu ztrátu absorbovaného CO_2 , a tím i značný pokles produkce sacharidů, ale umožňuje jí syntézu aminokyselin glycinu a serinu [6, 13]. Dochází k ní téměř výhradně u C_3 -rostlin, kde může způsobit ztrátu 20–40% primárně zachyceného CO_2 [6]. Fotorespirace pravděpodobně chrání fotosyntetický aparát před škodlivou fotooxidací [17].

S praktickým využitím fotosyntézy se můžeme setkat u výroby vodíku. K produkci vodíku biofotolýzou vody se nabízejí buď populace speciálních prokaryotických řas (sinic), nebo umělé systémy umožňující napojení světlem vyvolaného toku elektronů v chloroplastech na enzym hydrogenázu [13].

Chlorofyly a jejich deriváty

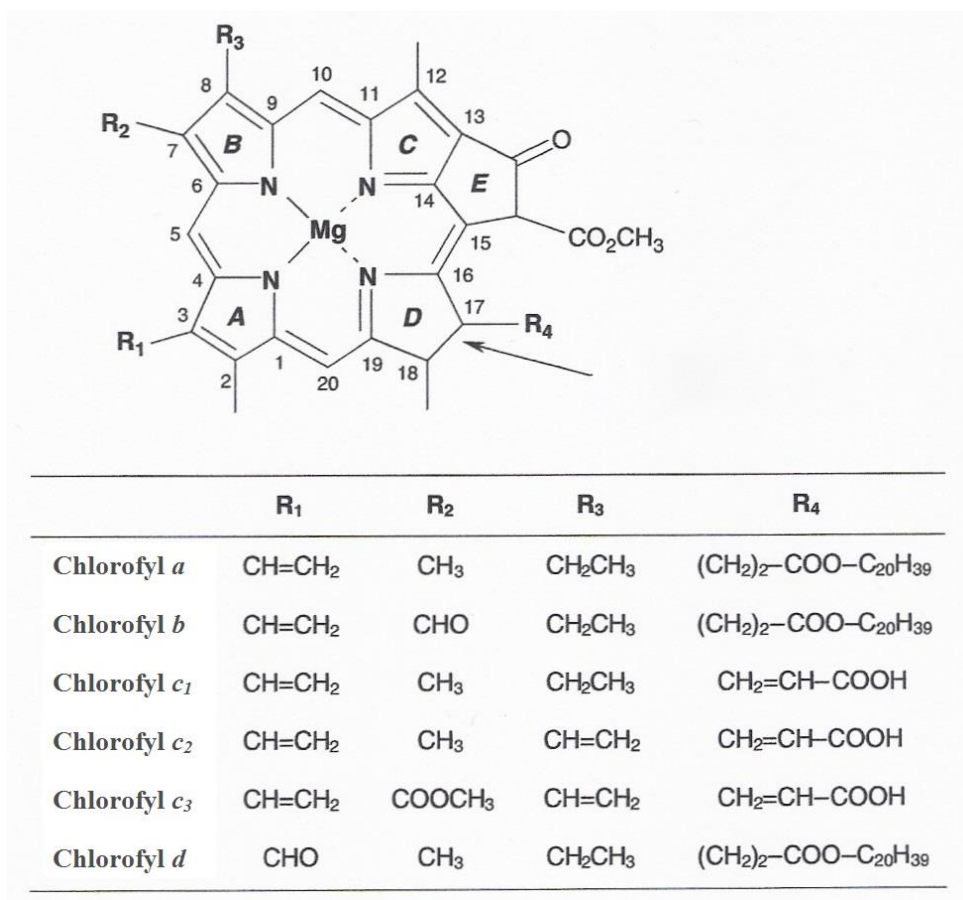
Poprvé se o důvod, proč jsou listy zelené, zajímali Pierre Pelletier a Joseph Caventou v roce 1818. O něco později Stokes (1864) zjistil, že jsou v listech obsaženy dva různé pigmenty, zelené a zároveň i žluté. Zelené pigmenty izoloval Stokes (1873) a dále ruský botanik Cvět (1906) separoval dva typy chlorofylu a karotenoidy pomocí sloupcové chromatografie, což je považováno za počátky chromatografie. Již zmíněné chlorofyly se označovaly α a β , později *a* a *b*. Postupem času byly z řas izolovány i další chlorofyly, např. *c* a *d* (tabulka II), a různé typy bakteriochlorofylů z fotosyntetických bakterií. [2, 9, 18]

Tabulka II. Obsažení chlorofylů ve vybraných organismech. [4, 16]

Organismy	Chlorofyl <i>a</i>	Chlorofyl <i>b</i>	Chlorofyl <i>c</i>	Chlorofyl <i>d</i>
Suchozemské rostliny	+	+	-	-
Zelené řasy	+	+	-	-
Rozsivky (<i>Diatoms</i>)	+	-	+	-
Obrněnky (<i>Dinoflagellates</i>)	+	-	+	-
Hnědé řasy	+	-	+	-
Červené řasy	+	-	-	+
Sinice	+	+	+	+

Za výzkum chlorofylu byly uděleny v minulém století tři Nobelovy ceny. V roce 1915 byl Richard Wilstätter oceněn za významný výzkum chlorofylu a dalších barviv. Hans Fischer získal v roce 1930 Nobelovu cenu za určení úplné struktury chlorofylu (především za strukturu hemu a jeho syntézu) a Robert Woodward obdržel cenu roku 1965 za vysvětlení syntézy chlorofylu. [15, 16]

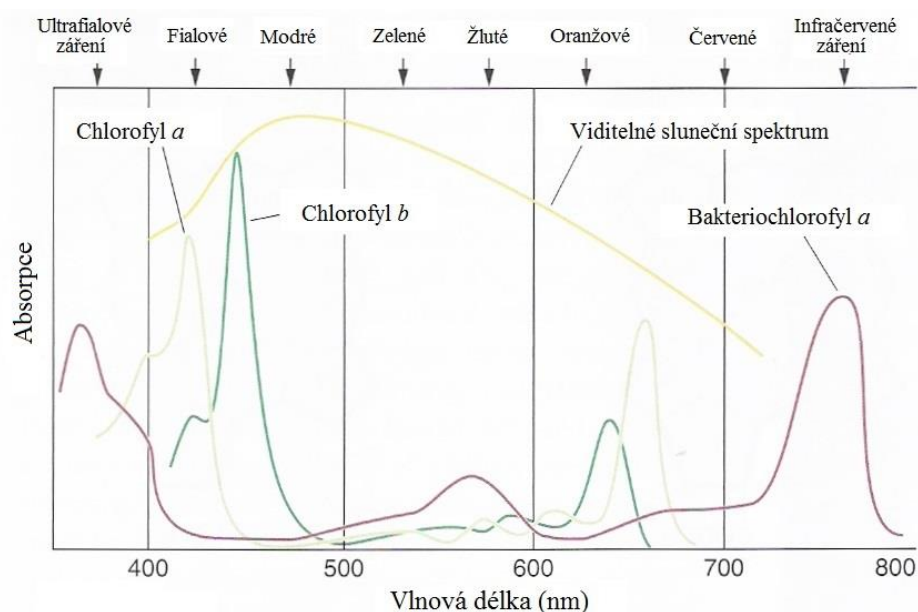
Mezi přírodní chlorofyly patří chlorofyl *a*, *b*, *c*, *d*, *e* a *f*. Liší se navzájem postranními řetězci na porfyrinovém kruhu [6]. Struktury některých z nich můžeme vidět na obr. 10. Strukturně příbuzná barviva jsou bakteriochlorofyly *a*–*g*.



Obrázek 10. Struktury molekul přírodních chlorofylů a rozdíly mezi nimi; šipka ukazuje, kde jsou dvojné vazby u všech chlorofylů *c*. [7]

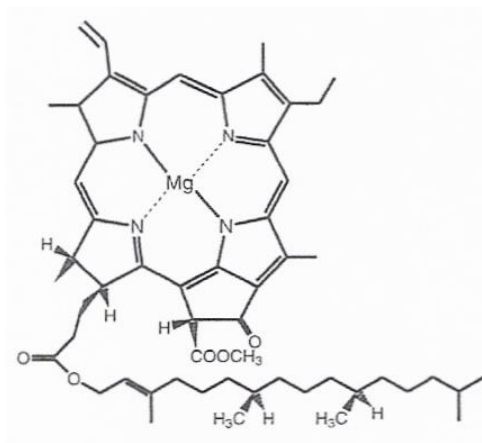
- **Chlorofyl *a* a *b***

Chlorofyly *a* a *b* jsou většinou zmiňovány společně, protože jsou obsaženy v listech zelených rostlin, a to většinou v poměru 2 : 1 (chlorofyl *a* : chlorofyl *b*) [9]. Chlorofyly absorbují světlo v modré a červené vlnové délce viditelného světelného spektra (obr. 11). Odraz zeleného světla, který je slabě absorbován chlorofyly *a* a *b*, tvoří barvy fotosyntetických tkání suchozemských rostlin [4].



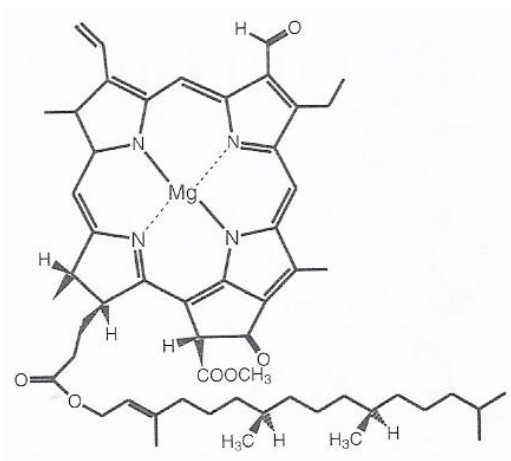
Obrázek 11. Absorpční světelná spektra chlorofylu *a* a *b* a bakteriochlorofylu *a* rozpuštěných v nepolárních rozpouštědlech. [4]

Sumární vzorec **chlorofylu *a*** je $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ (obr. 12). Nachází se ve všech známých eukaryotických organismech a v některých prokaryotických, především v sinicích (tabulka II). Je nejčastější složkou vodních systémů a hlavním zástupcem biomasy fytoplanktonu [19]. Barva tohoto pigmentu je modro-zelená. Pečlivé spektroskopické zkoumání živé buňky prokázalo přítomnost mnohočetných forem chlorofylu *a* *in vivo*. Tyto formy chlorofylu *a* mohou být spojeny s membránami a mají odlišné fotochemické funkce. [3] Při fluorescenci má chlorofyl *a* v thylakoidech maximální vlnovou délku 685 nm [8]. Univerzální rozšíření chlorofylu *a* u organismů s oxygením typem fotosyntézy vedlo ke správnému názoru, že pouze chlorofyl *a* je vlastním transformátorem energie ve fotosyntéze, který se bezprostředně účastní primárního fotochemického děje, tj. přeměny energie elektromagnetického záření v energii chemickou [17]. Ostatní barviva v thylakoidech jsou jen nápomocná chlorofylu *a*, zachycují dopadající sluneční záření a energii excitovaného stavu přenášejí právě na chlorofyl *a*. [1, 17]



Obrázek 12. Struktura molekuly chlorofylu *a*. [16]

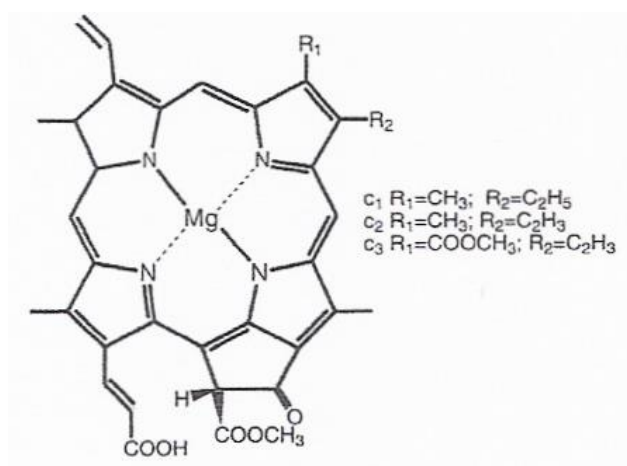
Chlorofyl *b* je žlutozelené barvivo a jeho sumární vzorec je $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$. Je totožný s chlorofylem *a* s výjimkou C-7 pozice, kde se změnila methylová skupina na formylovou (obr. 13) [4, 16]. Kvůli tomu se změnila absorpce světla. Jestliže je foton slunečního světla pohlcen chlorofylem *b*, je jeho energie přenesena na chlorofyl *a*, který se pak chová tak, jako by to byl on, kdo foton právě pohltit [1]. Chlorofyl *b* je hlavní pigment absorbující světlo ve většině eukaryotických fotosyntetických organismů s výjimkou červených a hnědých řas (tabulka II). Většina sinic obsahuje pouze chlorofyl *a* jako jediný typ chlorofylu, avšak chlorofyl *b* je obsažen v prochlorofytech (*Prochlorophyta*) [16].



Obrázek 13. Struktura molekuly chlorofylu *b*. [16]

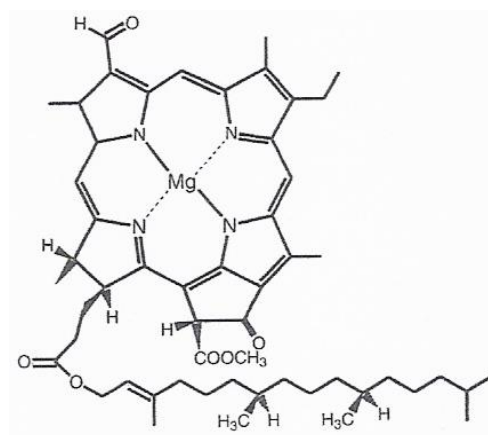
- **Ostatní chlorofyly a jiná fotosyntetická barviva**

Chlorofyl *c* je neobvyklý typ chlorofylu. Liší se od ostatních tím, že na pozici C-17 nemá isoprenoidní řetězec (fytyl) (obr. 14). Proto je chemicky klasifikován jako porfyrin, a ne jako chlorin. Chlorofyl *c* je obsažen v hnědých řasách, rozsivkách, obrněnkách a také v některých druzích sinic (tabulka II). Existují některé konstrukční varianty chlorofylu *c*, které se liší v některých periferních substituentech kruhu, jak je znázorněno na obr. 14. [16]



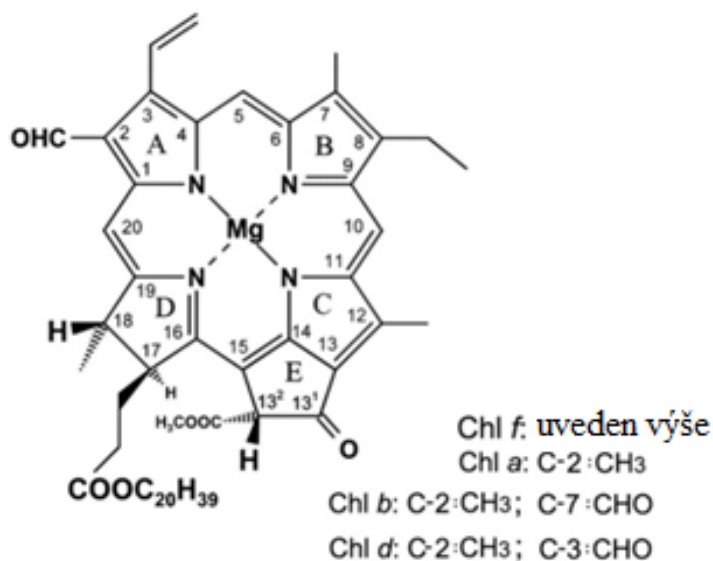
Obrázek 14. Struktura molekul typů chlorofylu *c*. [16]

Chlorofyl *d* se liší od chlorofylu *a* pouze substituentem na pozici C-3 (obr. 15). Až do nedávné doby byl známý jen u některých řas, kde tvořil zanedbatelné množství. Ale v roce 1996 byl objeven v sinicích *Acaryochloris marina* jako hlavní pigment, i když je tam v malém množství obsažen chlorofyl *a* (tabulka II). [16]



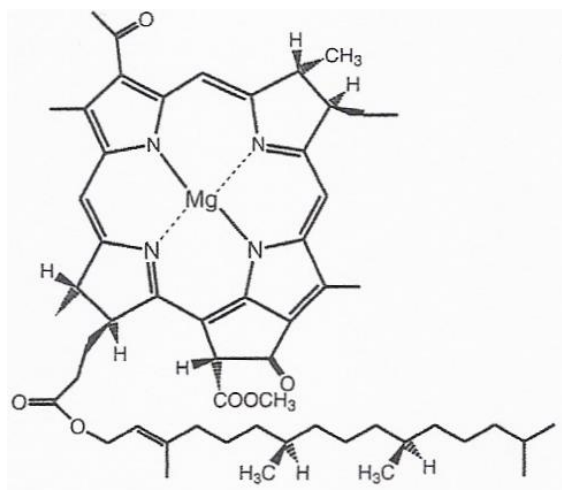
Obrázek 15. Struktura molekuly chlorofylu *d*. [16]

Chlorofyl e (obr. 16) byl získán pouze z jednoho organismu, řas nazývaných různobrvky [20]. **Chlorofyl f** byl objeven až v nedávné době. Analýzou extraktu ze stromatolitu ze zátoky Shark Bay v západní Austrálii byla metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC – High-Performance Liquid Chromatography) zjištěna komplexní směs chlorofylů, včetně chlorofylu *f*. Tento typ chlorofylu je obsažen ve vláknitých sinicích. Jeho nejvýznamnější absorpční vlnová délka se velmi blíží infračervenému záření, kolem 700 nm. [21]

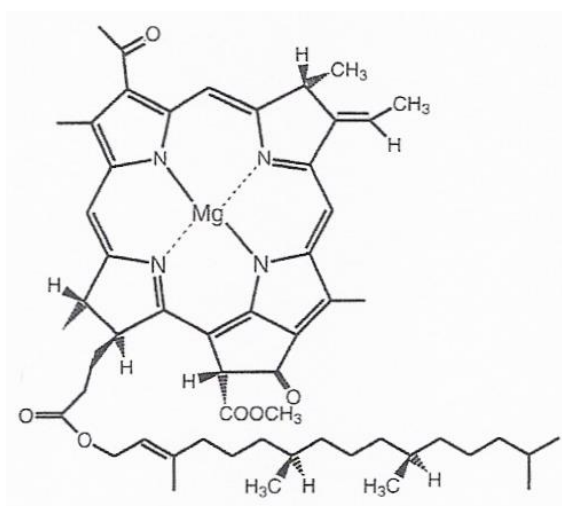


Obrázek 16. Chemická struktura chlorofylu *f* v porovnání s ostatními chlorofyly. [21]

Bakteriochlorofyly patří mezi fotoreceptory anaerobních fotosyntetických bakterií. Bakteriochlorofyl *a* (obr. 17) absorbuje světlo v jiných vlnových délkách než chlorofyly *a* a *b*, téměř na hranici s infračerveným zářením (obr. 11). Purpurové bakterie obsahují buď bakteriochlorofyl *a* nebo *b* (obr. 17 a 18), ale oba se ve stejném druhu současně nevyskytují. Bakteriochlorofyl *a* se ještě nachází v zelených sírných bakteriích (*Chlorobi*) a zelených nesírných bakteriích (*Chloroflexi*), kde jsou obsaženy i bakteriochlorofyly *c*, *d* a *e*. Bakteriochlorofyl *g* je obsažen v anoxygenních fototrofních bakteriích (*Heliobacteria*). [4, 16]

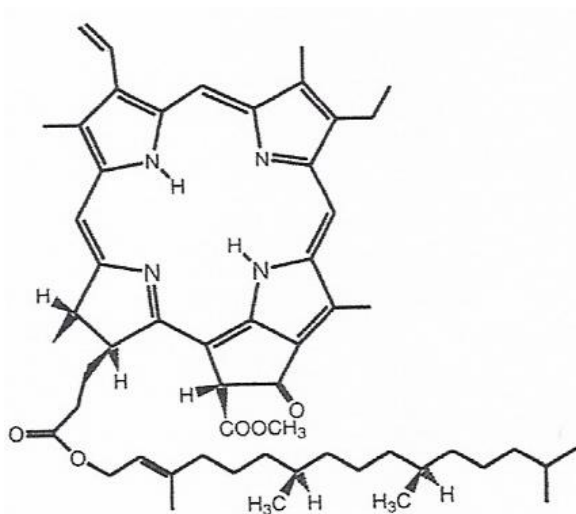


Obrázek 17. Struktura bakteriochlorofylu *a*. [16]



Obrázek 18. Struktura bakteriochlorofylu *b*. [16]

Feofytin *a* (obr. 19) je derivát chlorofylu neobsahující atom hořčíku [9, 16]. Jeho sumární vzorec je $C_{55}H_{74}O_5N_4$. Tento pigment má olivovou až žlutou barvu. Vzniká při zahřívání chlorofylu v kyselém prostředí, kdy se z molekuly odštěpuje ion Mg^{2+} . Specifická esteráza, nazývaná chlorofyláza, štěpí chlorofyl a feofytin na ethylchlorofylid a fytol, a kvůli tomu je jedním z činitelů způsobujících odbarvování (žloutnutí) zrajícího ovoce a jiných zelených pletiv v období vývoje plodu. [13, 16]



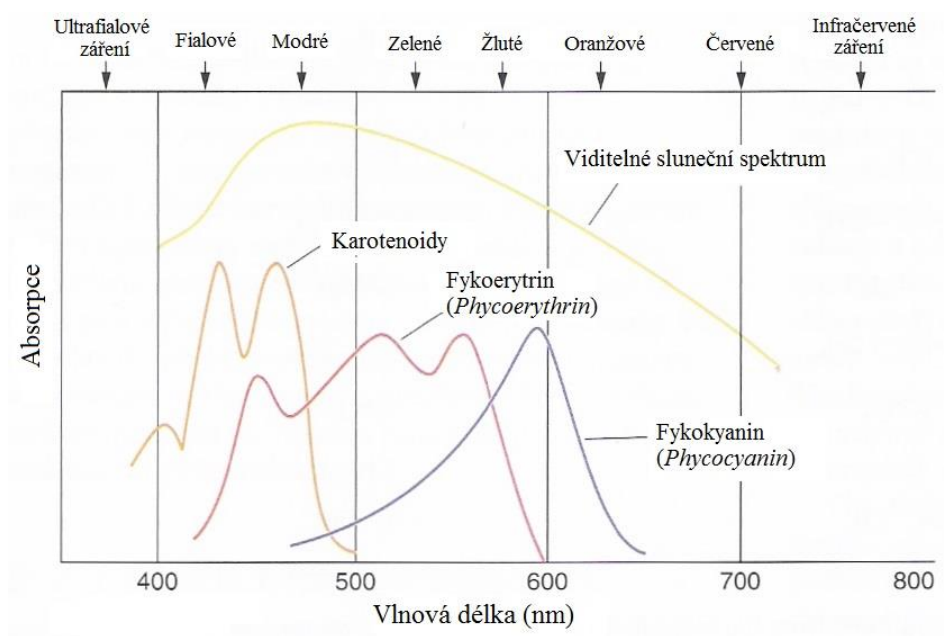
Obrázek 19. Struktura feofytinu *a*. [16]

2.1.2 Karotenoidy

Karotenoidy jsou jedny z nejrozšířenějších přírodních barviv. V přírodě bylo izolováno více než 600 různých karotenoidů. Avšak jen 40 z nich je obsaženo v typické stravě člověka a pouze 20 z těchto 40 bylo identifikováno v lidské krvi a tkáních. [22] Jsou to žlutá, oranžová a červená barviva, která se nachází v řasách, kvasinkách, houbách, plísních a bakteriích a ve všech třídách rostlin a živočichů, včetně savců. Žádné zvíře není schopné syntetizovat karotenoidy, ale získává je z potravy, kterou konzumuje. Karotenoidy, které jsou obsaženy v potravinách, jsou ve vodě nerozpustné, ale dobře rozpustné v tucích. Také to jsou významné fotosyntetické pigmenty, které jsou odolné vůči UV záření. Absorbují světlo o vlnových délkách mezi 400 a 500 nm (obr. 20), kde je absorpce chlorofylů velmi nízká. Převádějí energii do reakčního centra fotosyntézy (PS II). U některých karotenoidů má důležitý význam fotoprotekce, tj. ochrana buňky před vysokou citlivostí na sluneční světlo, kterou může způsobit i O_2 . Velké využití mají v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. [1, 3, 4, 23, 24]

Karotenoidy jsou skupinou vysoce nenasycených alifatických a alicyklických uhlovodíků a jejich oxidačních produktů obsažených v chromoplastech. Patří většinou mezi tetraterpeny, skupinu isoprenoidů se 40 uhlovodíkovou kostrou. Můžeme je rozdělit na acyklické, monocyklické a bicyklické. Karotenoidy se obecně dělí na dvě

skupiny: (1) uhlíkové karotenoidy, které jsou souhrnně nazývány karoteny a (2) xantofyly, které obsahují kyslík. [6, 23]

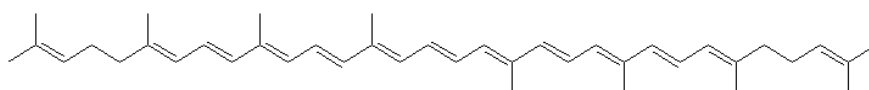


Obrázek 20. Absorpční spektra karotenoidů a dalších fotosyntetických pigmentů (*Phycoerythrin*, *Phycocyanin*). [4]

Karoteny

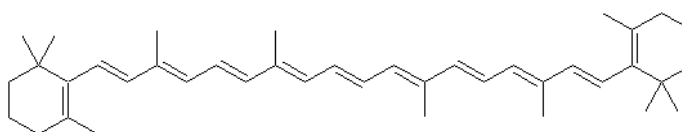
Karoteny jsou karotenoidy s obsahem uhlíku, které obsahují systém konjugovaných dvojných vazeb. Mezi nejdůležitější patří lykopen a α -karoten a β -karoten, které jsou známé jako zdroje vitamínu A v potravě. Další jsou například fytofluen, fytoen, neurosporen, γ -karoten, δ -karoten, ζ -karoten. [23, 25]

Lykopen (obr. 21) je nejběžnější acyklický karoten. Je zodpovědný za červenou barvu mnoha druhů ovoce a zeleniny, kupříkladu rajčat [22]. Dále se vyskytuje v červeném grapefruitu, vodním melounu, papáje, červené guavě a vedle β -karotenu i v šípcech. Je rozpustný v tucích a patří mezi významné antioxidanty. Lykopen se nachází ve většině lidských tkání, kde ale není uložen rovnoměrně [26]. Jeho příjem je spojován s prevencí rakoviny, osteoporózy, hypertenze a kardiovaskulárních chorob. Tato skutečnost vedla ke snaze zvýšit množství lykopenu v plodinách, které se často objevují v lidské stravě (především v rajčatech), pomocí genetického křížení. [22, 23, 25-27]



Obrázek 21. Struktura lykopenu.

β-karoten (obr. 22) je nejznámější a nejběžnější cyklický karoten. Jeho sumární vzorec je $C_{40}H_{56}$. Bicyklický α -karoten a monocyklický γ -karoten většinou doprovázejí β -karoten, ale obecně v mnohem nižších koncentracích. Společně se všechny tři formy uplatňují jako provitaminy vitaminu A. U zvířat se jedna molekula β -karotenu štěpí na dvě molekuly vitaminu A. Tento karoten můžeme nalézt v mrkvi, meruňkách, melounu, rajčatech, paprikách, ale i v zelených rostlinách (ve špenátu, kapustě, brokolici atd.). Stejně jako lykopen patří mezi důležité antioxidanty. Celkově je mezi karotenoidy nejhojněji zastoupen právě β -karoten, který se dnes vyrábí ve velkém měřítku synteticky; užívá se jako barvivo a potravinářské aditivum, a je součástí farmaceutických a kosmetických přípravků. [6, 22, 23, 27]

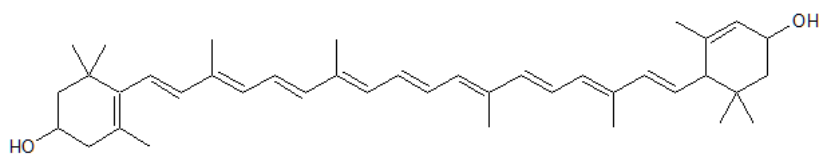


Obrázek 22. Struktura β -karotenu.

Xantofyly

Xantofyly jsou karotenoidy, které mají v molekule přítomný atom kyslíku. Mezi nejznámější patří lutein, dále pak zeinoxanthin a zeaxanthin. Náleží sem také epoxidové karotenoidy: neoxanthin, violaxanthin, β -karoten-5, 6-epoxid, lutein-5 či -6-epoxid.

Lutein (dihydroxy- β -karoten) (obr. 23) je žluté barvivo, které je obsaženo téměř ve všech zelených rostlinách. Jeho sumární vzorec je $C_{42}H_{56}O_2$. Největší množství je přítomno ve špenátu, kapustě, listech červené řepy, brokolici, hrášku, listovém salátu, kukuřici, ale i ve vaječném žloutku [22, 28]. Lutein podporuje zdraví očí, chrání kůži před UV (ultrafialovým) zářením a může snížit riziko kardiovaskulárních onemocnění [28].



Obrázek 23. Struktura luteinu.

Existují i karotenoidy, které jsou obsaženy v jiných potravinách, nejen v ovoci a zelenině. Astaxanthin a tunaxanthin jsou zástupci karotenoidů nacházejících se v rybách, jako je losos a pstruh, a většině korýšů (např. v krevetách, humrech a krabech). Za výzkum karotenoidů a vitamínu A získali Paul Karrer roku 1937 a Richard Kuhn v roce 1938 Nobelovu cenu. [6, 23]

2.2 Analytické metody používané pro identifikaci rostlinných barviv

Analytických metod vhodných k analýze rostlinných barviv je celá řada. Mezi nejvýznamnější patří chromatografické metody (oddíl 2.2.1), a to především papírová chromatografie, tenkovrstvá chromatografie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie a plynová chromatografie. Další velmi populární skupinou jsou spektroskopické metody: například spektroskopie ve viditelné oblasti (VIS Spectroscopy) a infračervená spektroskopie (IR-Spectroscopy) (oddíl 2.2.2). [29] Mezi dosud nepříliš často testovanou skupinou metod jsou hmotnostně spektrometrické techniky, např. MALDI-TOF (oddíl 2.2.3).

2.2.1 Chromatografické metody

Chromatografické metody patří do skupiny separačních metod a tvoří její největší část. Řadí se mezi nejdůležitější metody, které jsou vhodné k analýze směsí organických látek (tzv. analytické provedení), nebo aby umožnily vybrané složky izolovat (tzv. preparativní provedení). V dnešní době se používá mnoho chromatografických technik, založených na společném principu: separovaná směs se rozpustí v rozpouštědle (mobilní fázi) a nanese se na sloupec absorbentu (stacionární fáze) [2]. Název této metody vznikl spojením dvou řeckých slov χρομα (barva) a γραφειν (psát). Objevitelem chromatografie byl ruský botanik M. Cvět, který se jí

začal věnovat již v devadesátých letech 19. století. Snažil se odseparovat a izolovat jednotlivá barviva ze zelených listů tak, že extrakt rozpustil v organickém rozpouštědle a roztok nechal protékat svislou skleněnou trubicí naplněnou křídovým práškem (uhličitanem vápenatým). Různá barviva postupovala sloupcem odlišnou rychlostí, a tak vytvořila na bílém křídovém sloupci řadu barevných zón. I přes velký ohlas se na chromatografii na nějaký čas pozapomnělo. Dalšími průkopníky byli angličtí chemikové Martin a Synge, kteří v roce 1952 získali Nobelovu cenu za rozvoj chromatografie. K dalšímu důležitému a rychlému vývoji separačních metod došlo po druhé světové válce. Některé metody se používají až dodnes. [2, 6, 30-32]

Chromatografické metody lze rozdělit podle několika hledisek.

Podle skupenství mobilní fáze:

- **Plynová chromatografie** (GC – Gas Chromatography), kde mobilní fází je plyn.
- **Kapalinová chromatografie** (LC – Liquid Chromatography), kde mobilní fází je kapalina. Je známá především jako **vysokoúčinná kapalinová chromatografie** (HPLC – High-Performance Liquid Chromatography), kde se stacionární fáze skládá z velice malých kulovitých částic stejného průměru, a tím se zvýší výkonnost chromatografické kolony. Malé částice zajišťují velký povrch potřebný pro lepší adsorpci a kulaté, stejně velké částice, umožňují těsné a rovnoměrné uspořádání náplně. Jen 15 g těchto mikročástic má povrch odpovídající ploše fotbalového hřiště. K tomu, aby se rozpouštědlo dostalo přes tyto naskládané částice, jsou zapotřebí vysokotlaké pumpy. [2, 6, 33]

Podle uspořádání stacionární fáze:

- **Sloupcová chromatografie** (CC – Column Chromatography) má stacionární fází ve tvaru sloupce (neboli koloně) a někdy se jí též říká kolonová chromatografie. Dělená směs se rozpustí ve vhodném rozpouštědle a adsorbuje se na stacionární fází umístěnou ve skleněné trubicí. Sloupcem stacionární fáze se pak nechá protékat další rozpouštědlo (mobilní fáze), které v různém časovém odstupu vymývá jednotlivé složky směsi. [2]
- **Planární chromatografie** (plošné uspořádání) se obvykle dělí na **papírovou chromatografii** (PC – Paper Chromatography), kde se jako stacionární fáze

používá proužek papíru, a **chromatografii na tenké vrstvě** (TLC – Thin Layer Chromatography) s nepohyblivou fází ve formě tenké vrstvy sorbentu. [6, 30, 33]

Podle separačního principu:

- **Adsorpční chromatografie** – schopnost složek adsorbovat se na povrch stacionární fáze.
- **Rozdělovací chromatografie** – rozpustnost složek vzorku ve stacionární fázi (kapalina) a mobilní fázi (kapalina nebo plyn).
- **Iontově-výměnná chromatografie** – stacionární fází je iontoměnič (ionex), s nímž ionty vzorku elektrostaticky interagují. Jsou to převážně syntetické nerozpustné polyelektrolyty, které mohou podle své povahy vyměňovat buď kladné, nebo záporné ionty z mobilní fáze. Ale existují i měniče amfoterní, tedy měniče kationtů i aniontů. Dále měniče mohou být organické (syntetické pryskyřice) a anorganické (hydratované oxidy, zeolity, fosforečnany a další). [32]
- **Gelová (permeační) chromatografie** – stacionární fází je gel s póry, složky se separují podle velikosti na stacionární fázi; menší molekuly vzorku se v pórech zdržují déle (molekulově síťový efekt) [33]. Gely a částice jsou buď hydrofilní, nebo hydrofobní povahy [32].
- **Afinní chromatografie** – stacionární fáze je schopná vázat ze vzorku právě určité složky, ke kterým má úzce selektivní vztah (afinitu) [33]. Pokud jsou použity antigeny nebo protilátky, metoda je označována jako imunoafinitní a používána k čištění biologických molekul [34]. Někdy se této metodě říká bioafinitní a využívá specifické interakce, které mohou být biologické povahy (enzym – substrát, enzym – inhibitor, antigen – protilátka, receptor – agoista apod.) nebo biologickou interakci napodobující (bílkovina – triazinové barvivo, bílkovina – kovové ionty apod.) [6].

Při separaci se obvykle uplatňují fyzikálně-chemické děje, ale záleží na tom, který z nich převládá. Při jednom uspořádání se většinou využívá více těchto principů. [6, 33]

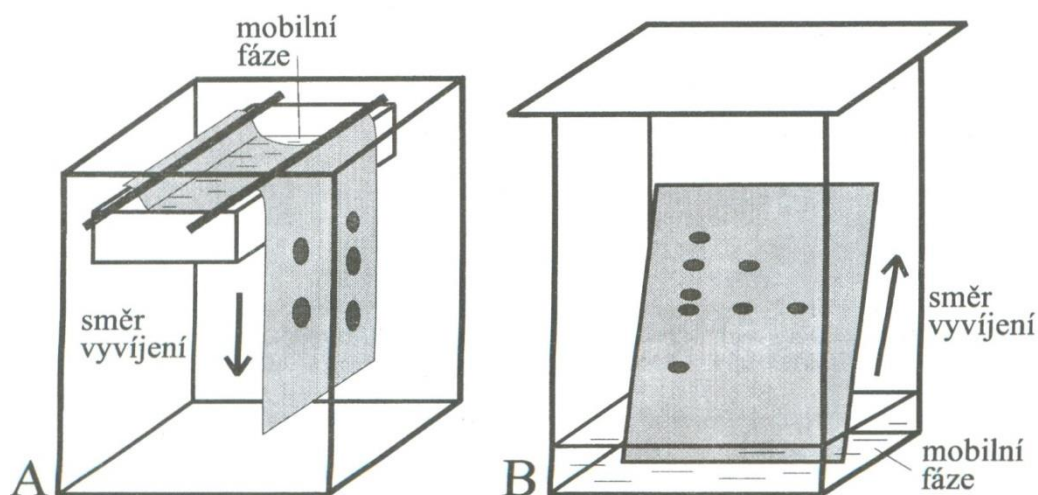
Tenkovrstvá chromatografie

Již několik desítek let uplynulo od objevu tenkovrstvé chromatografie. Tato metoda byla poprvé zmíněna v článku „Místo a aplikace chromatografické metody analýzy ve farmacii“, publikovaném v časopise *Farmatsiya (Farmacie)* v roce 1938 [35]. Autory tohoto článku byli ukrajinští vědci Izmailov a Schraiberová. Popisovali základy tenké vrstvy a využití ve farmacii. Látky se separovaly do zón pozorovaných na tenké vrstvě adsorbentů za použití pouhé kapky vzorku [36]. Společně zjistili, že tenkovrstvá chromatografie může nahradit sloupcovou absorpční chromatografií. Izmailov byl vynikající ukrajinský fyzikální chemik, doktor chemie a vedoucí fyzikálně-chemické laboratoře. Byl jedním z největších odborníků v elektrochemii, v oblasti sorpčních procesů a také chromatografií. Nejprve začal výzkumem nových léčivých látek a výzkumem metod pro jejich získání, především chromatografie. Spolupracoval se svou kolegyní Schraiberovou, která v době výzkumu metody byla postgraduální studentkou. Od roku 1944 se stala vedoucí vědeckou pracovnící a specialistkou v různých oblastech farmaceutické analýzy. [36, 37]

Tenkovrstvá chromatografie (TLC – Thin Layer Chromatography) je typ chromatografie v plošném uspořádání, která využívá principů kapalinové chromatografie. Liší se pouze uspořádáním stacionární fáze do tenké vrstvy, a ne do kolony. Nejběžnější způsob vyvíjení je vzestupně (ale možné je i horizontálně). Technika umožňuje rychlou analýzu velmi malého množství vzorku [27]. Jemně rozemleté částice stacionární fáze jsou nanесeny na inertní nosič (např. hliníkovou fólii nebo skleněnou destičku) a mobilní fáze není čerpána, ale nasávána kapilárními silami tenké vrstvy. Nejběžnějším sorbentem, materiálem pro absorpci látek, bývá silikagel; z dalších materiálů se užívá oxid hlinitý, celulóza nebo polyamid. Sorbent může obsahovat sádro, škrob, vinylové sloučeniny apod. Stacionární fáze se často objevuje ve formě destiček. Někdy se do nich přidává fluorescenční indikátor pro usnadnění detekce skvrn. Ty právě na takto upravené desce způsobují buď změnu její barvy, nebo zhašení fluorescence. [6, 30, 31]

V planárním uspořádání existuje ještě vedle tenkovrstvé chromatografie papírová chromatografie (PC). TLC je oproti PC účinnější, to znamená ostřejší dělení látek, a tím i kratší dráha (poloviční délka dráhy než pro PC) a kratší doba analýzy. Obě techniky se využívají k analýze organických, biochemických i anorganických vzorků. Jsou velmi

oblíbené pro nenáročnost a jednoduchost provedení. Uspořádání experimentu je u každé z nich odlišné. U PC se téměř výhradně setkáváme se sestupným uspořádáním, zatímco u TLC je nejběžnější způsob vzestupné uspořádání (obr. 24). [30, 32]



Obrázek 24. Chromatografické uspořádání sestupné (A) a vzestupné (B). [30]

Kvalitativní vyhodnocení chromatogramu tenké vrstvy je získáno výpočtem retardačních faktorů (R_F) separovaných látek. Retardační faktor se vypočítá jako podíl vzdálenosti středu skvrny oddělené látky A od startu (d_A) a vzdálenosti čela mobilní fáze od startu (d) (rovnice 7).

$$R_F = \frac{d_A}{d} \quad \text{Rovnice 7.}$$

Chromatografie na tenké vrstvě je jednou z nejrozšířenějších analytických metod, která se neustále vyvíjí. Již dlouho se používá ve vědě, průmyslu, medicíně, farmakologii, analýze životního prostředí a dalších odvětvích. [37]

2.2.2 Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie je jedna z nejdůležitějších analytických metod v současném vědeckém světě. Studuje interakce infračerveného záření s hmotou. Jednou z velkých výhod infračervené spektroskopie je její univerzálnost. To znamená, že je možné studovat prakticky každý vzorek v jakémkoli stavu (např. kapaliny, roztoky, pasty, filmy, vlákna, plyny a další) [38].

První infračervené spektrometry se začaly objevovat od 40. let 20. století. Jednalo se o disperzní přístroje využívající hranoly, které rozkládaly světelné záření. Velký průlom nastal až po roce 1950, kdy se do disperzních přístrojů vložily difrakční (ohybové) mřížky. Avšak největší pokrok je založen na objevu infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací FTIR. [38]

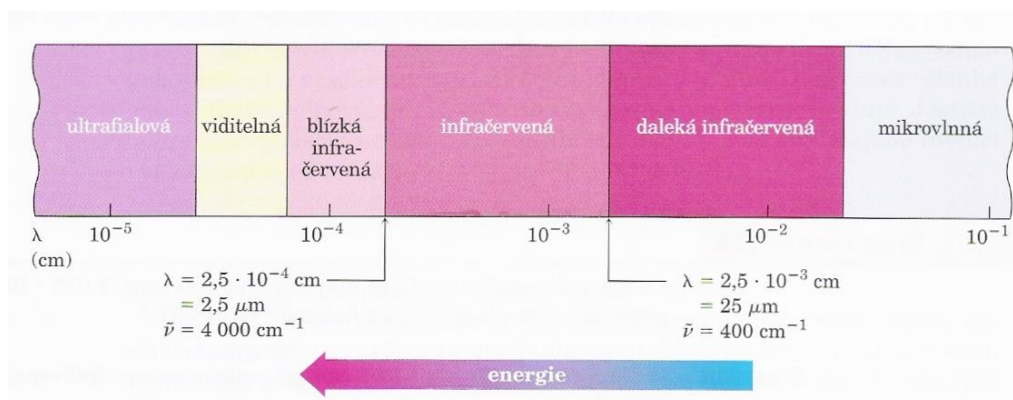
Jejím principem je absorpce záření o různých vlnových délkách molekulami studovaných látek. Infračervené záření je část elektromagnetického spektra, které má delší vlnovou délku než viditelné světlo, a zároveň má i nižší energii. Rozsah vlnové délky je v rozmezí přibližně 780 nm až 1 mm. U infračervené spektroskopie se obvykle místo vlnové délky používá vlnčet ($\tilde{\nu}$), převrácená hodnota vlnové délky, která se udává v reciprokých centimetrech (cm^{-1}) (rovnice 8).

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} \quad \text{Rovnice} \quad 8.$$

Infračervená spektroskopie pokrývá oblast 12800–10 cm^{-1} , kde největší význam pro studium látek má tzv. střední infračervená oblast 4000–400 cm^{-1} (v některých publikacích se udává 4000–670 cm^{-1} [33]). [2, 33, 38, 39]

Infračervenou oblast spektra rozdělujeme na tři části (obr. 25) [2, 33, 39]:

- Blízká infračervená oblast (NIR – Near Infrared)
(780 nm až 2,5 μm , tj. 12800–4000 cm^{-1})
- Střední infračervená oblast (MIR – Mid-Infrared)
(2,5–50 μm , tj. 4000–200 cm^{-1})
- Daleká infračervená oblast (FIR – Far Infrared)
(50–1000 μm , tj. 200–10 cm^{-1})

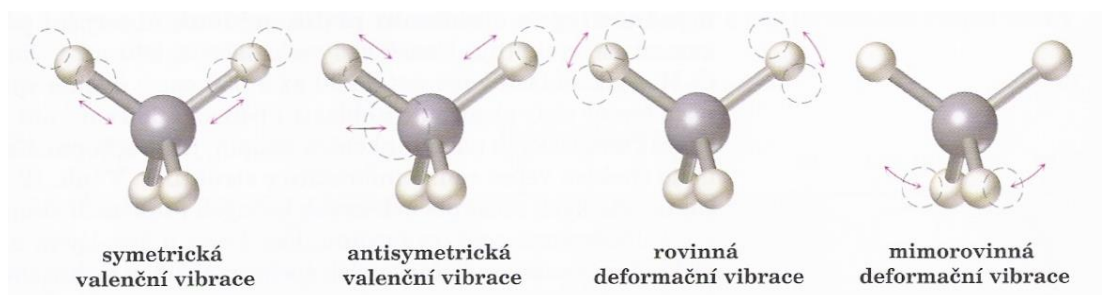


Obrázek 25. Infračervená oblast elektromagnetického spektra. [2]

Ve vzdálené infračervené oblasti jsou ve spektru obvykle přítomné nežádoucí silné absorpce vodní páry, které vyžadují buď proplachování celé optické linky suchým dusíkem, anebo zvlášť výhodné umístění přístroje. Nejčastěji používaným zdrojem záření je výboj rtuti do křemenného obalu, kdy záření s vyšším vlnovým číslem přichází spíše z křemene než z výbojové plazmy. U blízké a střední infračervené oblasti je funkčním prvkem obvykle difrakční mřížka nebo interferometr s děličem paprsku, který je vyroben z křemíku nebo germania, potaženého povlakem křemene, anebo z fluoridu vápenatého. [40]

Molekula studované látky je schopna absorbovat elektromagnetické záření tím, že mění stav elektronového obalu vibračními pohyby atomů a rotací molekuly jako celku. U vibrace se vazba mezi atomy chová jako pružina, na které vázané atomy vibrují, a energie vibrací závisí na hmotnosti vázaných atomů a na pevnosti vazby. Energie odpovídá pohybům uvnitř molekul a projevuje se neustálým natahováním a zkracováním vazeb, zvětšováním a zmenšováním valenčních úhlů, kýváním atomů apod. [2]. Rotace je pohyb molekuly kolem jejího těžiště a její energie je závislá na hmotnosti vázaných atomů a na délce vazby. [33]

U infračervené spektroskopie se setkáváme především s molekulovým vibračním pohybem. Jsou dva typy vibrací: valenční vibrace, při kterých se mění délky vazby, a deformační vibrace, při kterých se mění vazebný úhel (obr. 26). Pro stejnou skupinu atomů vždy platí, že vlnočty u deformačních vibrací jsou nižší než u valenčních. [39, 41]



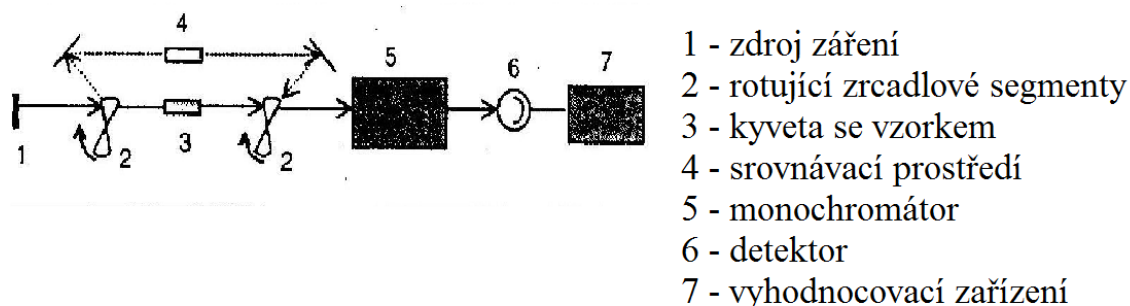
Obrázek 26. Ukázka vybraných vibračních pohybů. [2]

Výstupem infračervené spektrometrie je pásové spektrum, kde jednotlivé pásy odpovídají různým typům vibračních přechodů. Spektrum se rozděluje na dvě oblasti:

- Oblast skupinových vibrací (charakteristických vibrací) – mezi vlnočty 4000 a 1500 cm^{-1} se nacházejí absorpční pásy vibrací různých funkčních skupin, a proto se tato oblast využívá k jejich identifikaci v molekule organické látky [33].
- Oblast otisku prstu (*fingerprint region*) – mezi vlnočty 1500 a 400 cm^{-1} (nebo jen 670 cm^{-1}) se nacházejí pásy deformačních vibrací skupin, které jsou velmi silně ovlivněny vnějšími silami a celkovou strukturou molekuly. Pokud by se našly dvě sloučeniny, které by měly shodná infračervená spektra, musí být jistě identické. [2, 33]

Každá funkční skupina v molekule zkoumané látky vykazuje charakteristický soubor absorpcí v oblasti infračerveného záření, jejichž poloha se u jednotlivých sloučenin příliš nemění. Při interpretaci infračerveného spektra lze získat mnoho informací o struktuře také tím, že je jasně zřetelné, které frekvence infračerveného záření nebyly absorbovány. [2]

Infračervená spektra se měří ve spektrometrech, jehož jedna z možných konstrukcí je uvedena na obr. 27. Pomocí rotujících zrcadlových segmentů je záření ze zdroje střídavě pouštěno přes kyvetu se vzorkem nebo přímo vzorek a přes srovnávací prostředí. [33]



Obrázek 27. Schéma infračerveného spektrometru. [33]

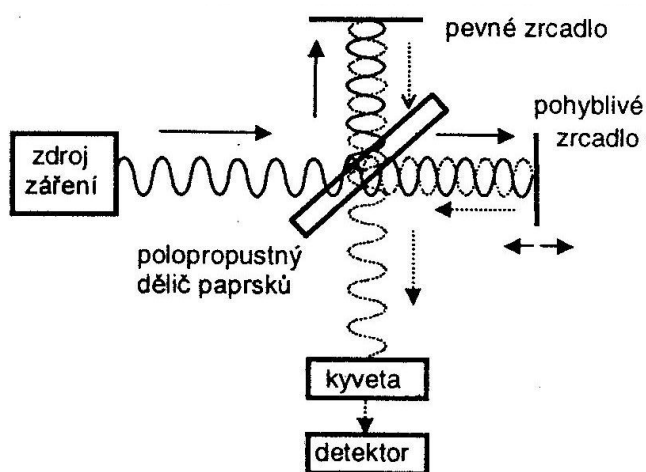
V monochromátoru se vymezuje vlnočet záření, které se měří v detektoru, kterých existuje několik typů [33]:

- **Goaylův pneumatický detektor** – infračervené záření svým tepelným účinkem určuje tlak plynu v malé cele, která je opatřena pružnou membránou sloužící jako zrcadlo.
- **Teplotní čidla** – používají se především bolometry, které sledují změnu elektrického odporu s teplotou.
- **DTGS detektory** – využívají pyroelektrického jevu: absorpcí záření se změní teplota pyroelektrického materiálu, to vyvolá elektrický náboj a výsledkem je měřitelný elektrický proud. Tento detektor se tak nazývá, protože obsahuje krystal DTGS (deuterovaný triglycinsulfát $(\text{ND}_2\text{CD}_2\text{COOD})_3\text{D}_2\text{SO}_4$).
- **MCT (Mercury-Cadmium Tellurid) detektory** – jsou to citlivější pyroelektrické detektory než DTGS a rychleji reagují; jsou však velice drahé a vykonávají svou funkci při chlazení kapalným dusíkem.

Infračervená spektrometrie se využívá v kvantitativní i kvalitativní analýze, a to zejména pro identifikaci organických a anorganických látek. Zjištěné spektrum vzorku je porovnáváno s jinými spektry, které jsou uloženy ve srovnávacích knihovnách referenčních spekter. Jednotlivé pásy jsou spojovány s funkčními skupinami podle svých vlnočtů. Zkoumají se také polohy a tvary pásů a vlivy ovlivňující struktury molekul.

Infračervená spektroskopie FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

V dnešní době jsou používány především infračervené spektrometry s Fourierovou transformací (FTIR – Fourier Transform Infrared), které zkoumají především střední infračervenou oblast. FTIR je založena na myšlence interference záření mezi dvěma paprsky, čímž byl získán *interferogram* [42]. Signál se vytvoří jako změna funkce délky dráhy mezi dvěma paprsky. Spektrometry FTIR (obr. 28) používají místo monochromátoru Michelsonův interferometr, který na principu interference zesiluje, resp. zeslabuje záření z polychromatického zdroje. Původní návrh Michelsonova interferometru je znám již od roku 1891 [40]. Jedna část paprsku záření dopadá na polopropustný dělič paprsků. Odráží se na pevné zrcadlo a pak se vrací na polopropustný dělič paprsků, kde jím proniká směrem ke vzorku. Druhá část paprsku prochází přes polopropustný dělič paprsků až k pohyblivému zrcadlu, kde se odráží k děliči a následně rovněž proniká směrem ke vzorku. V tomto místě se obě části paprsků setkávají a prolínají se (interferují), čímž se zesilují nebo zeslabují jednotlivé vlnové délky. Záření interaguje se vzorkem a dopadá na detektor – nejčastěji se používají DTGS a pro náročnější práce MCT detektor. Zjištěný signál se v počítači upraví Fourierovou transformací na absorpční infračervené spektrum. [33]



Obrázek 28. Schéma spektrometru FTIR. [33]

Základní dvě rovnice pro Fourierovu transformaci se týkají intenzity záření $I(\delta)$, dopadající na detektor a spektrální hustoty výkonu $B(\tilde{\nu})$ o určitém vlnovém čísle (známém též jako vlnčet, $\tilde{\nu}$) [38]. Vztahy mezi nimi jsou následující (rovnice 9 a 10):

$$I(\delta) = \int_0^{+\infty} B(\tilde{\nu}) \cos(2\pi\tilde{\nu}\delta) d\tilde{\nu} \quad \text{Rovnice} \quad 9.$$

$$B(\tilde{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta) \cos(2\pi\tilde{\nu}\delta) d\delta \quad \text{Rovnice} \quad 10.$$

Uvedené vztahy se od sebe liší mezemi integrálu, první z nich má interval od 0 do $+\infty$ a druhá od $-\infty$ do $+\infty$. Rovnice 9 ukazuje rozdíly hustoty energie v závislosti na rozdílu délky dráhy, kterou udává interferenční obrazec. Rovnice 10 popisuje změnu intenzity v závislosti na vlnočtu. Obě jsou převoditelné jedna na druhou pomocí Fourierovy transformace a právě ony definují vztah mezi interferogramem a spektrem [38, 43].

FTIR spektrometrie má řadu výhod oproti disperzním přístrojům. Během měření například nedochází k tak velkým ztrátám energie, jak tomu bylo u disperzních přístrojů. Má také vysokou rozlišovací schopnost, která je konstantní v celém spektru.

2.2.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS – Mass Spectrometry) je velmi účinná identifikační technika, která je široce používána k řešení analytických problémů v organické chemii, biochemii i při analýze anorganických materiálů a povrchů tuhých látek [31]. Výhodou hmotnostní spektrometrie, ve srovnání s jinými metodami, je vysoká citlivost, a proto je jednou z mála metod, které jsou vhodné pro identifikaci a stanovení koncentrace stopových množství vzorků [44]. Zjednodušeně je to metoda, která umožňuje stanovit relativní molekulovou hmotnost (M_r). Další informace o určité sloučenině se získává z rozpadu molekuly na jednotlivé fragmenty. [2]

Propojením hmotnostní spektrometrie s plynovou chromatografií (GC-MS) se docílí efektivnějšího měření a určení směsí organických látek a některých anorganických a organokovových látek. Známé využití je i ve formě kolonové kapalinové chromatografie (LC-MS) a tekutině v nadkritickém stavu (SFC-MS). [31]

Počátky a vývoj hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je v dnešní době jednou z nejdůležitějších fyzikálních metod analytické chemie [44]. Počátky této metody jsou spojovány s J. J. Thomsonem, který se zabýval přenosem elektřiny v plynech. Snažil se dokázat, že katodové paprsky jsou složené z částic, a změřit hmotnosti těchto neznámých částic. E. Everett, Thomsonův laboratorní asistent, byl expertem ve výrobě zařízení pro magnetické vychýlení způsobené katodovými paprsky. V roce 1897 společnými silami vyrobili přístroj k měření poměru náboje a hmotnosti e/m (dnes známé jako m/z), díky němuž Thomson objevil částici se záporným nábojem, nazývanou elektron. Thomson získal roku 1906 Nobelovu cenu za fyziku, jako velké uznání jeho zásluh ohledně teoretických a experimentálních výzkumů k dokázání elektrické vodivosti v plynech a následného objevu elektronu [45]. Poté začal spolupracovat se svým kolegou F. Astonem a společně sestavili první hmotnostní spektrometr. Toto zařízení mohlo detekovat celou řadu různých nabitých částic. Principem detekce iontů bylo nechat je projít elektrickými a magnetickými poli, aby se odrazily od parabolických drah a dopadly na plátno z fluorescenčního materiálu nebo fotografickou desku. Tímto způsobem byla zjištěna spektra O_2 , N_2 , CO , CO_2 , $COCl_2$ a v roce 1913 izotopy 20 a 22 neonu [46]. Avšak pomocí této techniky nebylo měření spolehlivé a přesné, proto se začaly zkoumat alternativní metody, které by ji mohly nahradit. [47]

Francis Aston se dále zabýval hmotnostní spektrometrií (MS) a roku 1919 vynalezl první hmotnostní spektrometr s poměrně vysokou rozlišovací schopností. Roku 1922 získal Nobelovu cenu za chemii, a to za objev izotopů, velkého množství neradioaktivních prvků, a za formulaci celočíselného pravidla [15]. Ve stejné době se touto metodou zabýval i A. J. Dempster, který vyvinul zdroj elektronové ionizace a první sektorový spektrometr. Roku 1934 R. Conrad aplikoval hmotnostní spektrometrii v organické chemii [46]. Dalšími významnými vědci, kteří přispěli k rozvoji hmotnostní spektrometrie, byli E. Goldstein, W. Wien, W. Kaufmann a K. T. Bainbridge. [46]

Dalším, kdo se zabýval sestavováním hmotnostních spektrometrů, byl elektroinženýr a fyzik Alfred Nier. Navrhl a sestavil několik revolučních přístrojů, např. 60° sektor, který snížil velikost potřebného magnetu (zmenšil velikost a potřebnou sílu) [48]. Později vytvořil spolu s Johnsonem hmotnostní spektrometr, který v sobě obsahoval

elektrostatické a magnetické analyzátory spojené v unikátní konfiguraci [48]. Tento design patřil k nejlepším řešením pohonu přístroje své doby. Nier se snažil i o propagaci hmotnostní spektrometrie nejen mezi fyziky, ale i mezi jiná odvětví vědy. Věřil, že by tato metoda mohla mít široké uplatnění a mohla by být využita i pro jiné účely a experimenty. V roce 1940 objevil izotop uranu, ^{235}U , který byl zodpovědný za pomalé neutronové štěpení. [46, 48]

Do roku 1940 byly hmotnostní spektrometry dostupné pro širokou veřejnost a propagovány jako užitečné přístroje pro fyzikální a chemické vědy. Avšak pro většinu oddělení byly tyto přístroje velmi drahé, a proto o ně nebyl velký zájem. Ale to se změnilo díky práci tří farmaceutických společností v USA, které zastupovali vědci Fred McLafferty, Klaus Biemann a Carl Djerassi. Každý z nich se snažil určit prostřednictvím experimentů fragmentační mechanismy pro různé třídy organických molekul. To společně pomohlo stanovit struktury neznámých molekul pomocí MS. Společně položili základy pro moderní biologickou MS. McLafferty společně s R. Gohlkem v roce 1956 vynalezli první hmotnostní spektrometr s plynovou chromatografií a roku 1974 se R. Gohlke podílel na vzniku prvního hmotnostního spektrometru s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií [46]. Biemann studoval organickou syntézu se specializací na alkaloidy a peptidy. Účastnil se konference, kde přednášel William H. Stahl, který popsal identifikaci aromatických sloučenin v ovoci, většinou malých organických sloučenin, pomocí MS a porovnal je s databází známých spekter. To ho velmi zaujalo a inspirovalo k dalšímu výzkumu. Biemann zjistil, že komplexní molekuly mohou být zkoumány pomocí MS, a jako první aplikoval MS na přírodní produkty neznámé struktury. Djerassi se zaměřil na terpenoidy, steroidy a alkaloidy. Jejich práce rozhodně pomohla rozvinout nové poznatky ohledně MS a vytvořit novou generaci vědců zabývajících se hmotnostní spektrometrií. [48]

Alan Marshall a Melvin Comisarow jako první aplikovali novou metodu hmotnostní spektrometrie, Fourierovou transformaci iontové cyklotronové rezonance (FTICR – Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance) v roce 1974 [46]. Marshall se nejprve zabýval nukleární magnetickou rezonancí (NMR – Nuclear Magnetic Resonance) a Comisarow ICR spektroskopií. A právě kombinace znalostí z těchto dvou odvětví byla příčinou vzniku FTICR MS. ICR byla známá již od roku 1949, kdy H. Sommer, H. A. Thomas a J. A. Hipple popsali první poznatky o nové metodě

hmotnostní spektrometrie ICR [46]. Principem této metody jsou ionty, ozářené oscilačním polem, které jsou poháněny do většího poloměru otáčení a do fáze soudružnosti (všechny ionty se stejnou m/z se pohybují synchronizovaně). Ionty procházejí detektorem a jsou zachyceny jako indukovaný elektrický proud. ICR bez využití Fourierovy transformace (FT) by trvala dlouhou dobu, díky FT byl výpočet znám tisíckrát rychleji a ionty se mohly měřit současně. Vzhledem ke své extrémně vysoké rozlišovací schopnosti FTICR MS je dnes jednou z nejcennějších metod pro analýzu komplexních směsí. [48]

Do roku 1980 již bylo možné analyzovat malé organické molekuly pomocí MS. Ale u větších molekul, především proteinů, nukleových kyselin a komplexních sacharidů, to nebylo zcela možné uskutečnit. Proto se v roce 1988 objevily dvě nové metody MS, ionizace elektrosprejem (ESI – Electrospray Ionization) a laserová desorpce/ionizace

za účasti matrice (MALDI – Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization). Tyto revoluční ionizační techniky v MS jsou do dnešních dnů jedny z nejpoužívanějších metod. Objevení ESI učinil John Fenn a jeho postgraduální student Masamichi Yamashita. Nejprve jej zkusili na malých molekulách, vitamínech, které nejsou tepelně stálé, a proto u nich nemohly být aplikovány jiné formy ionizace MS. Po slibných začátcích zkusili analyzovat aminokyseliny, dále vysokomolekulární polymery a nakonec i celé proteiny. John Fenn obdržel v roce 2002 Nobelovu cenu za chemii za výzkum ESI. Přibližně ve stejné době jako Fenn Franz Hillenkamp a Michael Karas začali vyvíjet techniku MALDI. O tuto metodu se zajímal ještě T. Tanaka, který byl oceněn v roce 2002 Nobelovou cenou za chemii za laserovou metodu desorpční ionizace bílkovin. Nicméně se za objevitele MALDI obvykle považují pánové Hillenkamp a Karas [46, 48, 49]. Tyto dvě různé metody, ESI a MALDI, jsou konkurující, ale zároveň i doplňující, protože k většině zkoumání lze využít alespoň jednu z nich. ESI se jednodušeji kombinuje se separačními metodami (např. HPLC), zato MALDI se může využít i pro kontaminující látky (např. soli, detergenty). [48]

V minulosti byla ještě spousta objevitelů, které mají něco společného s hmotnostní spektrometrií. Byli zmíněni především ti nejznámější. Hmotnostní spektrometrie se neustále vyvíjí a jsou získávány stále nové poznatky.

Princip hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometr je přístroj pro určení poměru hmotnost/náboj a relativního množství nabitých fragmentů [27]. Jednotkou hmotnosti je Da (Dalton), která udává počet atomových hmotnostních jednotek (roven molární hmotnosti). Běžný hmotnostní spektrometr se skládá z těchto hlavních částí: vstupu, iontového zdroje, separátoru, detektoru se zesilovačem a záznamovým zařízením a vakuového systému [31]. Vstup může být přímý nebo přes zásobník, ve kterém se vzorek vypaří. V iontovém zdroji se molekuly vzorku rozpadají na ionty odštěpením valenčních elektronů. Hmotnostní spektrometr v té nejjednodušší formě má tři základní funkce [44]:

- Vytvářet ze vzorků molekul ionty v plynné fázi, což se nazývá **ionizace**. Lze ji provést v iontovém zdroji a může zahrnovat vzorek molekuly, který je ve stavu páry, v pevném stavu nebo v roztoku.
- Separovat ionty v plynné fázi, což probíhá v hmotnostním analyzátoru podle poměru m/z .
- Rozpoznat a zaznamenat separované ionty.

Většinou jsou tyto úkony prováděny ve vakuu, avšak díky nedávnému vývoji existuje již i přístroj, který pracuje za atmosférického tlaku [44]. Výstupní data jsou uspořádána ve formě **hmotnostního spektra**, které má obvykle podobu čárového grafu. Na ose x jsou hmotnostní jednotky (m/z) a na ose y je intenzita (relativní četnost iontů, tj. počet iontů o daném m/z , které dopadají na detektor) [2]. Tyto ionty zaznamenáme v grafu jako píky. Většinou píky odpovídají hmotnostem iontů, protože náboj je roven 1. [27, 31]

Hmotnostní spektrum sloučenin může být považováno za určitý druh „molekulového otisku prstu“ [2]. Je téměř vyloučeno, že by dvě různé sloučeniny měly naprosto totožná hmotnostní spektra. Existuje databáze několika set tisíc spekter, která se jmenuje *Registry of Mass Spectral Data*. [2]

Ionizací může být několik typů:

- **Elektronová ionizace** (EI – Electron Ionization) – první využívaná metoda ionizace, vhodná pro celou řadu syntetických a přírodních látek. Není vhodná pro nestabilní sloučeniny nebo pro ty, které mají molekulovou hmotnost větší než 800 Da. [44]

- **Chemická ionizace** (CI – Chemical Ionization) – ionty jsou charakteristické pro analyt, který je produkován iontově-molekulovou reakcí. Na rozdíl od EI, která vytváří pouze kladné ionty, může být CI využita pro výrobu kladných i záporných iontů. [44]
- **Bombardování rychlými atomy** (FAB – Fast Atom Bombardment) – použití energetických částic bombardování jako prostředku pro odpařování vzorku a ionizaci. Vzorek je zaveden jako viskózní kapalina, která je bombardována proudem energetických atomů nebo iontů. To má za následek rozprášení molekul vzorku. Poté je tento shluk iontů analyzován v hmotnostním spektrometru. [50]
- **Ionizace elektrosprejem** (ESI – Electrospray Ionization) – vzorek je vstříkován ve formě zředěného roztoku přes jemnou clonu nebo kapiláry k vytvoření jemného spreje nebo proudu kapiček, které nesou elektrostatický náboj. Rozpouštědlo se v přístroji odpaří, kapičky se od sebe elektrostaticky odpudí a nabitě částice jsou převedeny do vakuové komory spektrometru. [50]
- **Laserová desorpce/ionizace za účasti matrice** (MALDI – Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization) – vzorek je začleněn do pevné matrice. Puls iontů, vyrobených touto metodou, se nejčastěji zkoumá metodou analýzy **TOF** (Time of Flight). Tato kombinace ionizace a hmotnostního analyzátoru (MALDI-TOF) byla v této práci využita pro určení hmotnosti vzorků.

Jakmile jsou ze vzorku vytvořeny ionty, jsou urychleny a převedeny pomocí elektrického pole do hmotnostního analyzátoru. Těch existuje celá řada, např. Time of Flight (TOF), kvadrupólový analyzátor, iontová past, iontová cyklotronová rezonance. U všech těchto metod se ionty oddělují na základě m/z . [50]

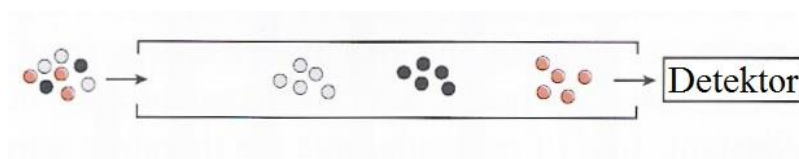
Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight)

Tato metoda je založena na využití energie laseru k ionizaci a desorpci analyzovaných částic. Funguje tak, že se analyt ve velmi nízkých koncentracích (méně než 1 : 1000) smísí s roztokem **matrice** a ponechá s ní společně vykrytalizovat [34]. Matrice se využívá pro svou schopnost absorbovat světelnou energii předávanou laserem, protože samostatný analyt není schopen tuto energii absorbovat. Matrice musí být dostatečně nestálá, aby se odpařovala působením laseru, jako například 2,5-dihydroxybenzoová (DHB) kyselina [44, 50].

Metoda analýzy TOF je vhodná především pro ionizační metodu MALDI. V TOF technice se používá přímé měření rychlosti (v) nabitých iontů. Kinetická energie získané částice procházející elektrostatickým potenciálem (V) se rovná zeV (rovnice 11) [50]. Náboj částice se udává jako ze .

$$\frac{1}{2} mv^2 = zeV \quad \text{Rovnice} \quad 11.$$

TOF funguje tak, že se do vakuované letové trubice vstříkne nenápadný puls molekulárních iontů a měří se čas potřebný pro ionty k dosažení detektoru (obr. 29) [50]. Tento typ analyzátoru může být použit pro měření poměrně velkých makromolekul.



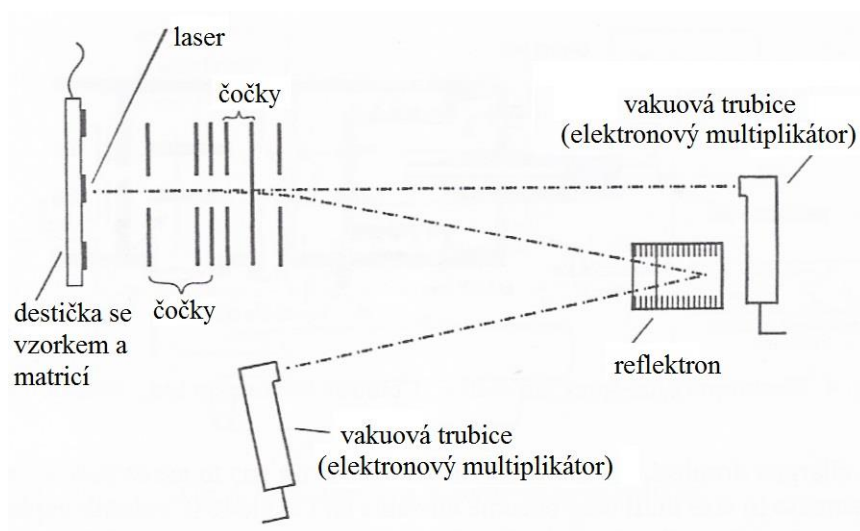
Obrázek 29. TOF separace částic s různými rychlostmi/hmotnostmi v letové trubici.

[50]

Metoda hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF byla využita v této práci k analyzování vzorku (obr. 30). Při měření v pozitivním módu přístroje byly detekovány pouze kationty $[M_r+H]^+$ a v negativním módu anionty $[M_r-H]^-$.

Tento typ hmotnostní spektrometrie se používá pro sloučeniny, které by mohly snadno fragmentovat, jako jsou proteiny, oligonukleotidy, glykoproteiny, oligosacharidy,

syntetické polymery a velké anorganické sloučeniny [44, 46]. Vhodným zvolením matrice je MALDI tolerantnější vůči přítomnosti anorganických a organických kontaminantů než ostatní ionizační techniky [44].



Obrázek 30. Technika MALDI spojená s TOF analyzátozem. [44]

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie a materiál

Aceton – C_3H_6O , původ: LACH-NER

Aceton čistý – C_3H_6O , původ: LACH-NER

Acetonitril (ACN) – CH_3CN , původ: Sigma

Benzín lékařský RN ČL 2009 (Petrol Medical RN), původ: LACH-NER

Diethylether – $C_4H_{10}O$, původ: LACH-NER

2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DHB), původ: Sigma

Pepmix (Bruker Daltonics, Německo)

Písek mořský (SEA SAND), původ: LACH-NER

Tenká vrstva Silufol – TLC hliníková fólie Silikagel 60F254, tloušťka vrstvy 0,2 mm, původ: Merck KGaA

Trifluoroctová kyselina (TFA) – CF_3COOH , původ: Sigma

Uhlíčan hořečnatý čistý – $MgCO_3$, původ: Lachema n.p. Brno

Přístrojové vybavení:

Hmotnostní analyzátor MALDI-TOF Autoflex speed, výrobce Bruker (Německo), VŠCHT Praha

IKA Minishaker MS2

Infračervený spektrometr NICOLET 6700 FT-IR, výrobce Thermo-Scientific, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Laboratorní optomechanická váha OWA LABOR na Katedře chemie a didaktiky chemie Pedagogické fakulty Univerzity Karlovy v Praze

3.2 Identifikace rostlinných barviv metodou tenkovrstvé chromatografie

K identifikaci rostlinných barviv byly využity zelené listy rostlin, které jsou vhodné pro extrakci listových barviv [51, 52]. Byl vybrán jetel luční (*Trifolium pratense*), který je v přírodě volně dostupný. Byl nasbírán na louce a k experimentu byly použity pouze mladé zelené listy. Pro uchování barviv v listech byly zelené části ihned po sběru zmrazeny a vyndány až těsně před extrakcí. Dále bylo extrahováno barvivo z barevných listů javoru mléč (*Acer platanoides*).

3.2.1 Extrakce listových barviv acetonem

Postup extrakce listových barviv acetonem byl převzat z protokolu [52], který nejspíš vycházel z knihy Základy biochemie [51], kde je postup popsán téměř stejně.

Přibližně 5 g rozmražených zelených listů jetele lučního (*Trifolium pratense*) bylo natrháno na malé kousky a vloženo do třecí misky. K nim se přidalo 1,5 g mořského písku, na špičku lžičky uhličitanu hořečnatého a 10 ml vychlazeného acetonu. Vše se roztřelo tloučkem, až vznikla řídká zelená kaše. Büchnerova nálevka, vyložená filtračním papírem, byla pro lepší extrakci zvlčena acetonem. Vzniklá zelená kaše se rovnoměrně rozvrstvila na filtr a odsávací baňka se napojila k automatické vodní vývěvě. Extrakt byl odfiltrován za několik minut. Zelené zbytky na filtru byly nakonec prolity 15 ml vychlazeného acetonu a opět vyextrahovány. Pro lepší a rychlejší získání extraktu byla využita zátka reagenční láhve, s kterou se stlačovala zelená kaše rovnoměrně po filtru. Vzniklý zelený extrakt byl dále využit pro dělení barviv metodou TLC. Stejný postup byl použit i pro získání barviv z barevných listů javoru mléč (*Acer platanoides*).

3.2.2 Dělení listových barviv na tenké vrstvě Silufol

Postup dělení byl převzat z protokolu [53], který byl nejspíš opět inspirován knihou Základy biochemie [51].

Nejprve se ustříhla část tenké vrstvy Silufolu (přibližně 5 × 10 cm). Na ní se obyčejnou tužkou vyznačila čtyři místa startu tak, aby byla přibližně 1 cm od okraje desky, a zároveň stejně vzdálená od sebe. Na ně bylo kapilárou postupně nanášeno

několik desítek kapek extraktu. Připravila se eluční směs benzin – aceton – diethylether v poměru 5:2:1. Tudíž se smíchalo 100 ml benzínu lékařského, 40 ml acetonu a 20 ml diethyletheru. Směs se nalila do skleněné vany a přiklopila se. Tenká vrstva Silufolu, se zaschnutými vzorky na startu, se pomocí pinzety vložila do skleněné vany s eluční směsí, přiklopila a ponechala se vyvíjet. Přibližně po 15 minutách působení došlo k oddělení listových barviv na tenké vrstvě. Deska se z vany pinzetou vyjmula a nechala oschnout. Zbytek nevyužitě eluční směsi, uzavřený v reagenční láhvi, se uchoval v chladničce pro další experiment.

3.3 Charakterizace listových barviv metodou infračervené spektroskopie

Pro určení listových barviv byl využit infračervený spektrometr NICOLET 6700 založený na metodě FTIR. Výsledné spektrum zkoumaného vzorku metodou ODRAZ se zobrazil v programu OMNIC (verze 8.3). Pro měření byl nastaven počet skenů 128 a rozlišení 4. Nejprve se zkoumal vzorek stacionární fáze, která byla vystavena vzlínání mobilní fáze, bez obsahu barviva. Tenká vrstva se seškrábala na destičku, vložila do infračerveného spektrometru a změřilo se její absorpční spektrum. Stejný postup se provedl i pro určení zeleného barviva.

3.4 Hmotnostní charakterizace oddělených listových barviv metodou MALDI-TOF MS

Toto navazující měření se může rozdělit na čtyři odlišná experimentování:

Postup pro měření I – jen stacionární fáze a destilovaná voda (blank)

Nejprve se do jednotlivých polí ocelové destičky („spotů“) nanese 1 μ l destilované vody. Jednotlivá barviva se seškrábala z tenké vrstvy pomocí špachtle a každé z nich se rozpustilo v jedné kapce vody na ocelové destičce.

Postup pro měření II – stacionární fáze s matricí

Byl využit podobný postup jako pro měření I, až na to, že místo destilované vody byla použita matrice. Matrice vznikla smícháním 150 μ l acetonitrilu

(ACN), 250 μ l 2% trifluoroctové kyseliny (TFA), 100 μ l H₂O a 9 mg 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny (DHB).

Postup pro měření III – stacionární fáze s mobilní fází

Jednotlivá barviva se špachtlí seškrábala z tenké vrstvy a vsypala do mikrozkušavek. K nim se přidalo 50 μ l (u menšího množství vzorku jen 30 μ l) mobilní fáze (eluční směsi využitá při tenkovrstvé chromatografii). Aby se vzorky lépe rozpustily v mikrozkušavkách, byla k jejich promíchání využita orbitální „třepačka“ Minishaker. Po rozpuštění stacionární fáze v mobilní fázi se nechaly mikrozkušavky několik minut stát, aby se nerozpuštěné částice usadily u dna. Poté se pipetou odebral 1 μ l rozpuštěné části, který se pak přenesl na měřicí ocelovou destičku.

Postup pro měření IV – stacionární fáze s mobilní fází a následné přidání matrice

Postup byl shodný jako u měření III až do fáze, kdy se částice nechaly usadit. Poté se odpipetovalo co nejvíce roztoku (odhadem 25 μ l) do čisté mikrozkušavky. Do ní se přidalo 5 μ l matrice známého složení a promíchalo se. Po usazení se 1 μ l roztoku odpipetoval na vzorkovací ocelovou destičku. Přenesení muselo proběhnout velmi rychle a přesně, protože se extrakční směs/eluční směs rychle vypařuje. Zároveň byla vyvíjena snaha, aby pozorovaný vzorek byl bez obsahu nerozpuštěných částic (platí i u měření III). Toto měření se uskutečnilo 2 krát v rozmezí 14 dní.

Po zaschnutí vzorků se ocelová destička vložila do hmotnostního spektrometru, ovládaného počítačem. U každého vzorku bylo získáno hmotnostní spektrum, které vzniklo spojením několika měření (přibližně 5–10 nejzdařilejšími) z různých míst vzorku. Pro lepší charakterizaci jednotlivých listových barviv se změřila i destilovaná voda se stacionární fází, která byla vystavena vztlínání mobilní fáze, a samostatná matrice. Detekce iontů byla nastavena na rozsah 220–1800 Da.

Přístroj byl před měřením kalibrován na komerční směs Pepmix a při vyhodnocování spekter bylo nutné počítat s přesností měření $\pm 0,8$ Da.

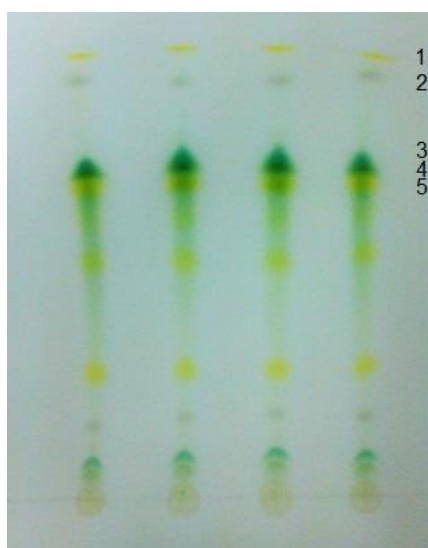
Hmotnostní spektra byla vyhodnocována softwarem mMass (verze 5.5.0).

4 Výsledky a diskuze

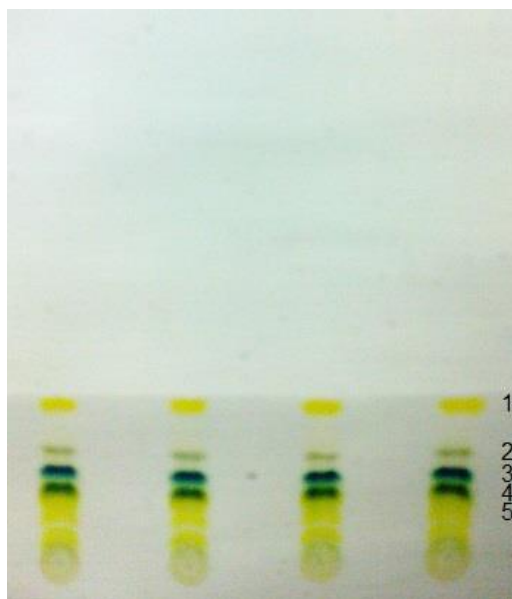
4.1 Izolace listových barviv metodou TLC

K izolaci bylo nejprve využito zelených listů jetele lučního (*Trifolium pratense*). Toto dělení se opakovalo několikrát, vždy před měřením hmotnostního spektrometru. Doba mezi izolací a následným měřením trvala obvykle jeden den. Avšak první měření proběhlo až po dvou dnech, kdy se zjistilo, že oddělená barviva na stacionární fázi postupem času blednou. Proto se pro zvýšení šance na úspěšnou charakterizaci muselo začít s identifikací barviv pomocí hmotnostní spektrometrie co nejdříve.

Izolace barviv se řídila již zmíněným postupem (oddíl 3.2.1 a oddíl 3.2.2). Jak je možno vidět na obr. 31, zelený extrakt se na tenké vrstvě oddělil na jednotlivá barviva. Již od začátku vyvíjení mobilní fáze byla jednotlivá barviva jasně zřetelná (dle literatury [54, 55] se jednalo především o β -karoten, feofytin *a*, chlorofyl *a* a *b*, lutein a další karotenoidy), a dokonce barevně více sytá než na konci vyvíjení (obr. 32). Retardační faktory oddělených vzorků barviv na tenké vrstvě jsou uvedeny v tabulce III. Hodnoty faktorů byly spočítány aritmetickým průměrem z pěti tenkých vrstev oddělených barviv jetele lučního (*Trifolium pratense*), které byly úplně odseparované.



Obrázek 31. Oddělená barviva z listů jetele lučního (*Trifolium pratense*) metodou TLC; 1 = β -karoten, 2 = feofytin *a*, 3 = chlorofyl *a*, 4 = chlorofyl *b*, 5 = lutein, od č. 5 níže se vyskytují další barviva (karotenoidy), u kterých není známé přesné pořadí.

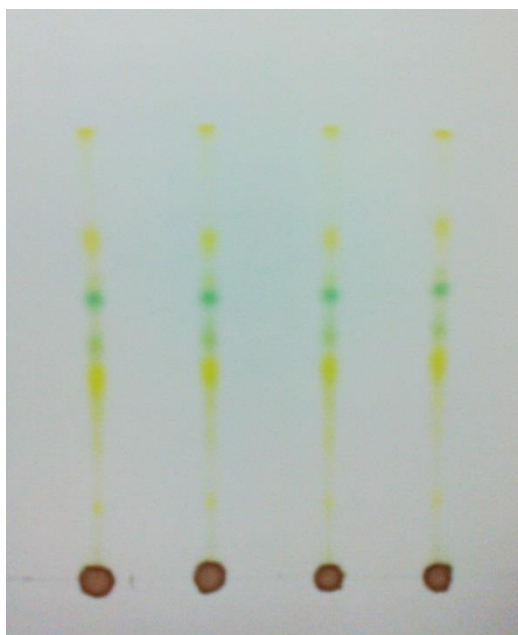


Obrázek 32. Průběh vyvíjení extraktu jetele lučního metodou TLC; 1 = β -karoten, 2 = feofytin *a*, 3 = chlorofyl *a*, 4 = chlorofyl *b*, 5 = lutein (lépe zřetelný až po úplném oddělení barviv).

Tabulka III. Retardační faktory známých odseparovaných barviv zjištěné z chromatogramů extraktu jetele lučního (*Trifolium pratense*).

Barvivo	Retardační faktor R_F
β -karoten	0,97
feofytin <i>a</i>	0,85
chlorofyl <i>a</i>	0,66
chlorofyl <i>b</i>	0,64
lutein	0,61

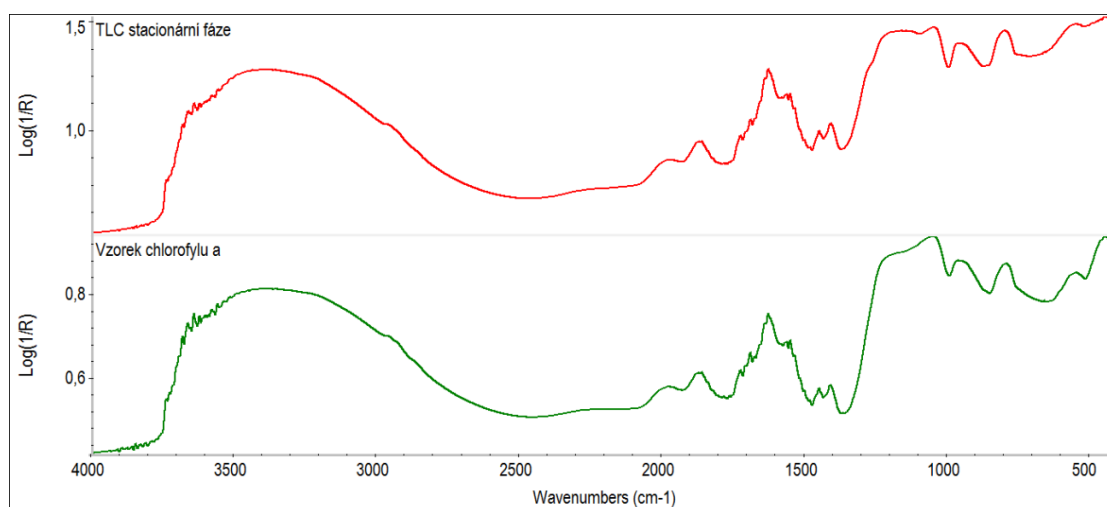
Avšak z extraktu barevných listů javoru mléče (*Acer platanoides*) se vůbec neoddělily červené a žluté složky (obr. 33), které jsou odpovědné za podzimní zbarvení listů. Oddělily se pouze zbytky barviv, které jsou charakteristické pro zbarvení listů dozelená. Je možno vidět, že hlavní barviva zůstala na startu a mobilní fáze nebyla schopna je oddělit. Pro jejich oddělení by byl nejspíše vhodný jiný typ vyvíjecí soustavy.



Obrázek 33. Oddělená barviva barevných listů javoru mléče (*Acer platanoides*) metodou TLC.

4.2 Charakterizace chlorofylu *a* metodou infračervené spektroskopie FTIR

Pro charakterizaci rostlinných barviv byla vyzkoušena metoda infračervené spektroskopie FTIR. Měření se uskutečnilo jen pár hodin po oddělení barviv metodou TLC. Nejprve se měřila samostatná stacionární fáze, a poté vzorek zeleného barviva (chlorofylu *a*) ze zelených listů jetele lučního (*Trifolium pratense*). Při analýze rostlinných barviv touto metodou se muselo počítat s tím, že paprsek prochází vzduchem, CO₂ a vodou, než vůbec dopadne na měřený vzorek obsažený ve stacionární fázi. Proto se nejdříve muselo změřit tzv. background, tedy spektrum stacionární fáze společně s vlivy atmosférické vody a CO₂, které by jinak výrazným způsobem deformovaly výsledné spektrum. Následně byla jednotlivá spektra stacionární fáze a chlorofylu *a* porovnána (obr. 34).

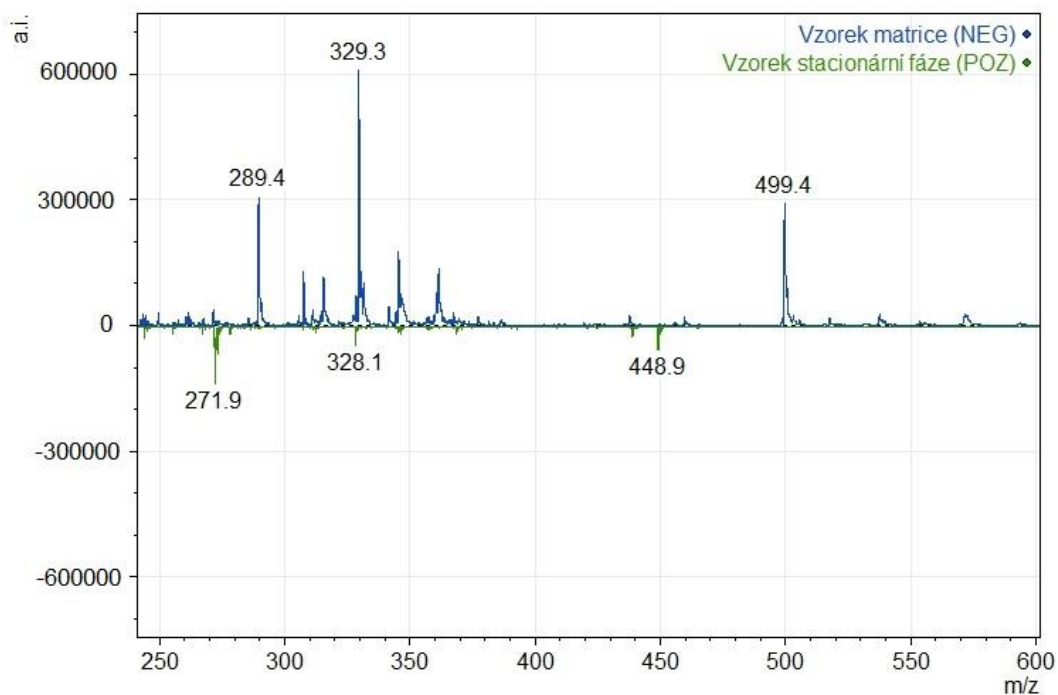


Obrázek 34. Porovnání stacionární fáze a vzorku chlorofylu *a* z TLC.

Z obrázku 34 je zřetelně patrné, že obě spektra (blanku a vzorku z místa nejintenzivněji zabarveného barvivem) jsou identická – barvivo se ve spektru absorpčně vůbec neprojevílo, a proto charakterizace izolovaných barviv metodou FTIR nebyla úspěšná. Obsah barviva ve stacionární vrstvě byl i přes intenzivní zabarvení skvrny pod detekčním limitem FTIR, a proto nemělo význam zabývat se ostatními, méně intenzivními skvrnami (barvivy).

4.3 Charakterizace barviv metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Pro charakterizaci listových barviv bylo využito metody hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Byly vyzkoušeny různé postupy přípravy vzorku pro měření hmotnostním spektrometrem (oddíl 3.4). Pro všechna měření byla využita ionizace jak v negativním (NEG), tak v pozitivním módu (POZ). Pro lepší rozlišení hmotností zkoumaných barviv byla naměřena i spektra samostatné stacionární fáze (vystavené vyvíjení mobilní fáze) s destilovanou vodou a vzorku matrice (obr. 35).

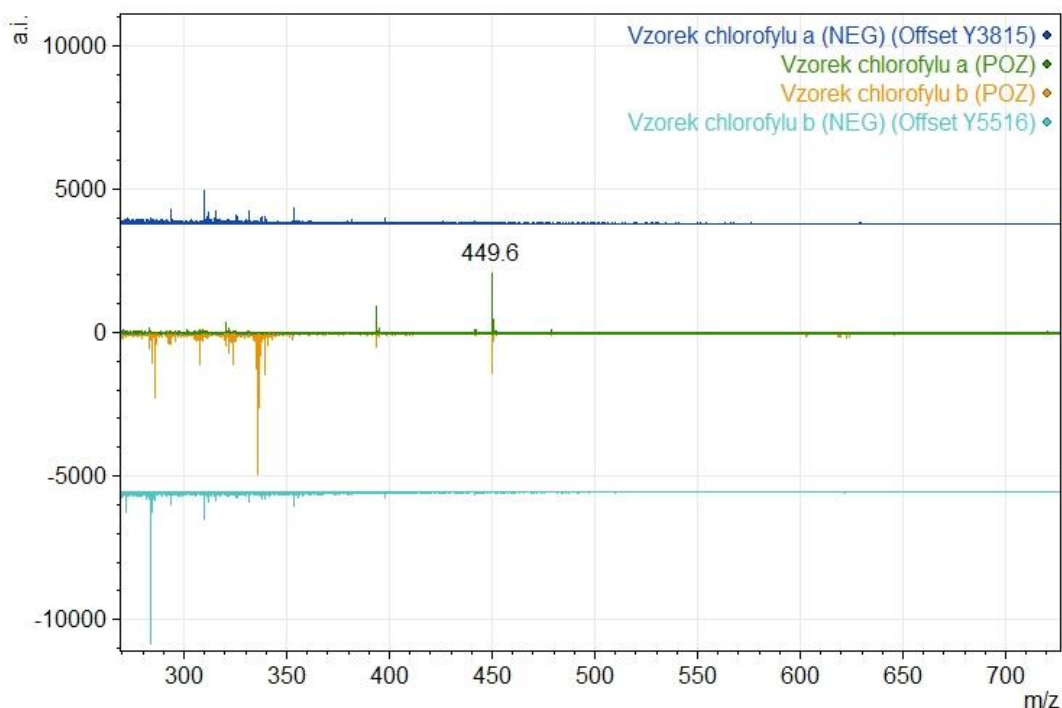


Obrázek 35. Zjištěná spektra vzorku matrice v negativním módu a vzorku stacionární fáze s destilovanou vodou v pozitivním módu.

Měřením bylo zjištěno, že píky o hodnotách přibližně 289,4; 329,3 a především 499,4 m/z ze vzorku matrice změřené v negativním módu a píky o hodnotách 271,9; 328,1 a 448,9 m/z ze vzorku stacionární fáze změřené v pozitivním módu se vyskytují v téměř všech spektrech zkoumaných barviv.

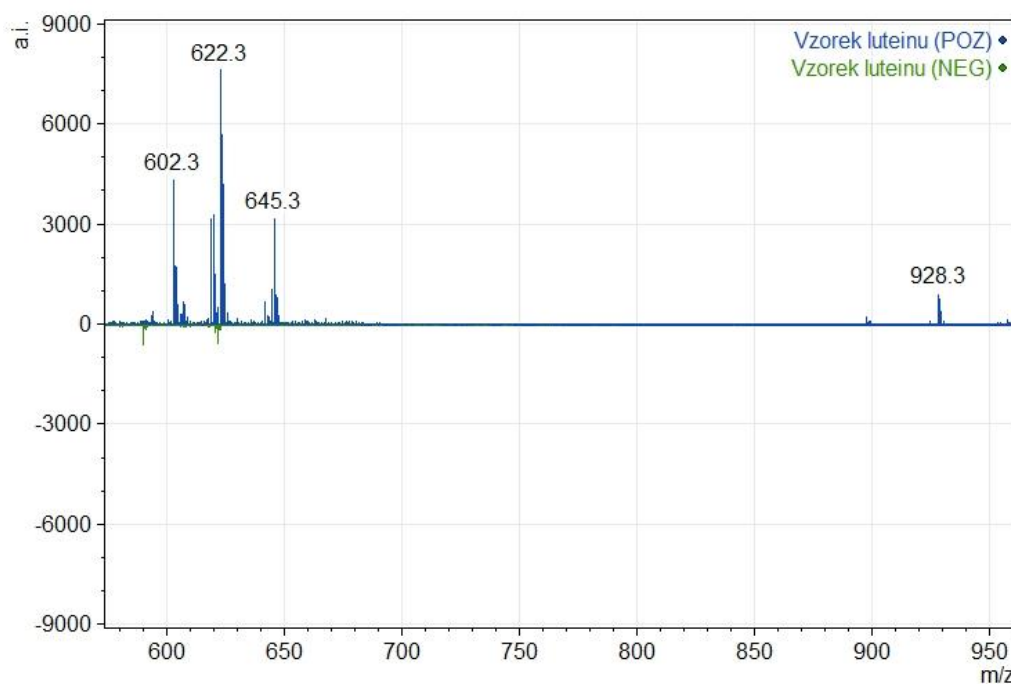
4.3.1 Měření I

Toto měření bylo v principu nejjednodušším postupem přípravy vzorku. Díky tomuto měření bylo zjištěno, že bez použití matrice není možné identifikovat žádné z hledaných barviv. Porovnání spekter chlorofylů *a* a *b* změřených v pozitivním módu (obr. 36) ukázalo u obou vzorků přítomnost píku 449,6 m/z , který s největší pravděpodobností představuje pozůstatek stacionární fáze (hodnota 448,9 m/z , s přesností měření $\pm 0,8$). Vyšší hodnoty než 500 m/z se ani v jednom spektru naměřeném v pozitivním/negativním módu neobjevily.



Obrázek 36. Porovnání spekter chlorofylů *a* a *b* v pozitivním a negativním módu, které byly získány z měření vzorků připravených podle postupu měření I.

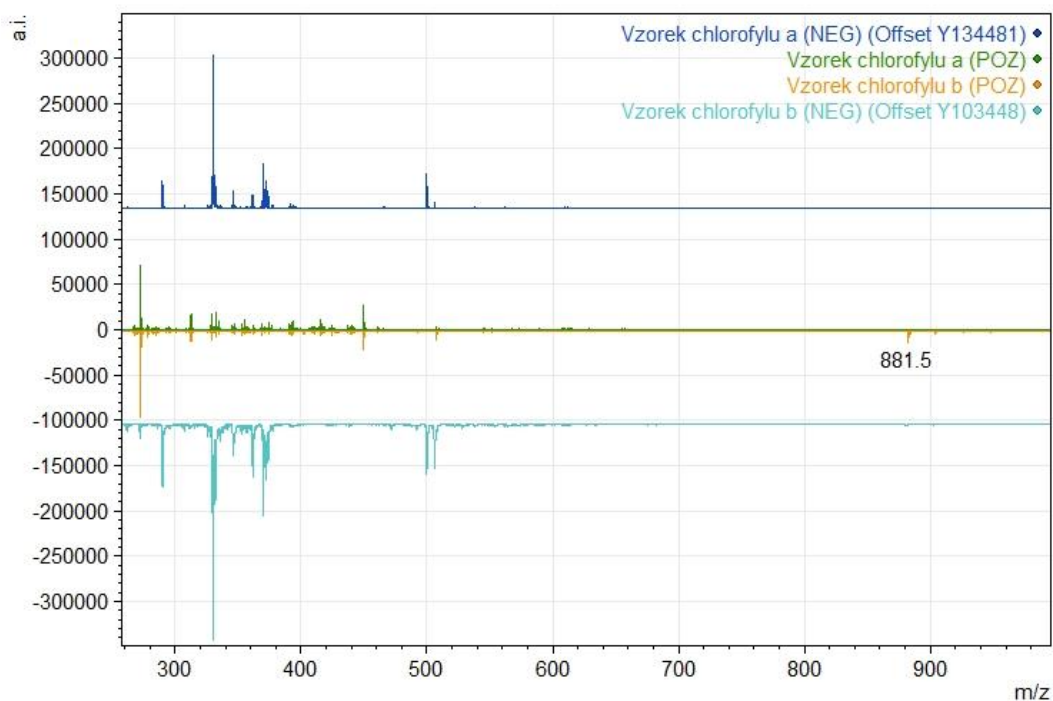
U vzorku luteinu byly naměřeny hodnoty 602,3; 622,3; 645,3 a 928,3 m/z (obr. 37). Ve spektru získaném v pozitivním módu můžeme pravděpodobně přiřadit jediné hodnotu 602,3 m/z k barvivu neoxanthinu, či violaxanthinu ($M_r = 601,4$). Měřením v pozitivním módu přístroje jsou detekovány pouze kationty $[M_r+H]^+$ – hodnoty o 1 vyšší než je M_r . Není možné přesně určit, o které z těchto dvou barviv se jedná, protože jejich molekulové hmotnosti jsou stejné. To, že se ve spektru vyskytlo jiné barvivo než lutein, je možným důsledkem pochybení při odebírání a přípravě vzorku. U zbývajících tří hodnot neměřených v pozitivním módu (622,3; 645,3 a 928,3 m/z) neznáme původ jejich výskytu ve spektru, a proto je nemůžeme přiřadit k žádnému barvivu.



Obrázek 37. Porovnání vzorku luteinu v pozitivním a negativním módu připraveného podle postupu měření I.

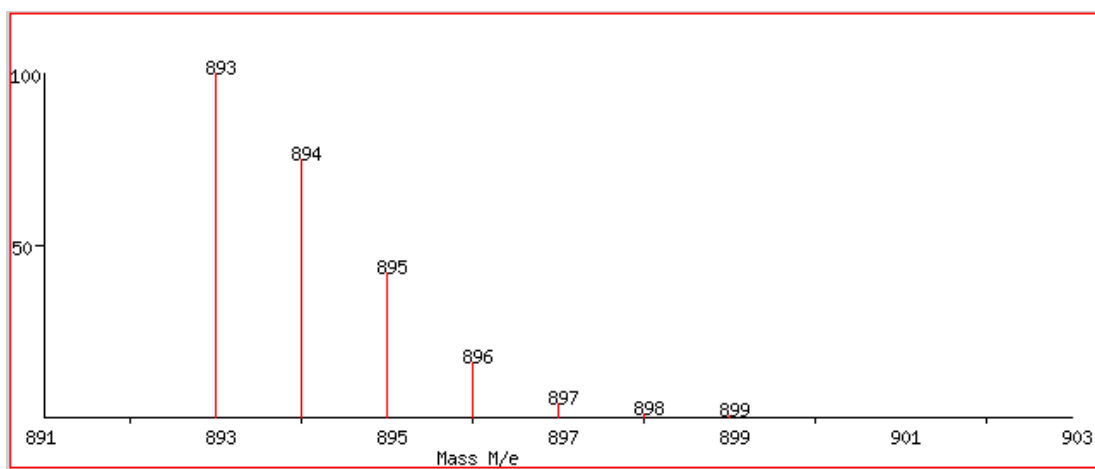
4.3.2 Měření II

Ani u měření II nebylo možné zjistit přesné hmotnosti barviv. U porovnání spekter chlorofylu *a* a *b* bylo zjištěno, že v pozitivním i v negativním módu jsou obě spektra téměř totožná (obr. 38) a neobsahují hledané hodnoty m/z . Pro porovnání je na obr. 39 uvedena izotopová distribuce v chlorofylu *a* a na obr. 40 izotopová distribuce v chlorofylu *b* (nenabitě molekuly) zjištěná pomocí izotopové distribuční kalkulačky (<http://www.sisweb.com/mstools/isotope.htm>).

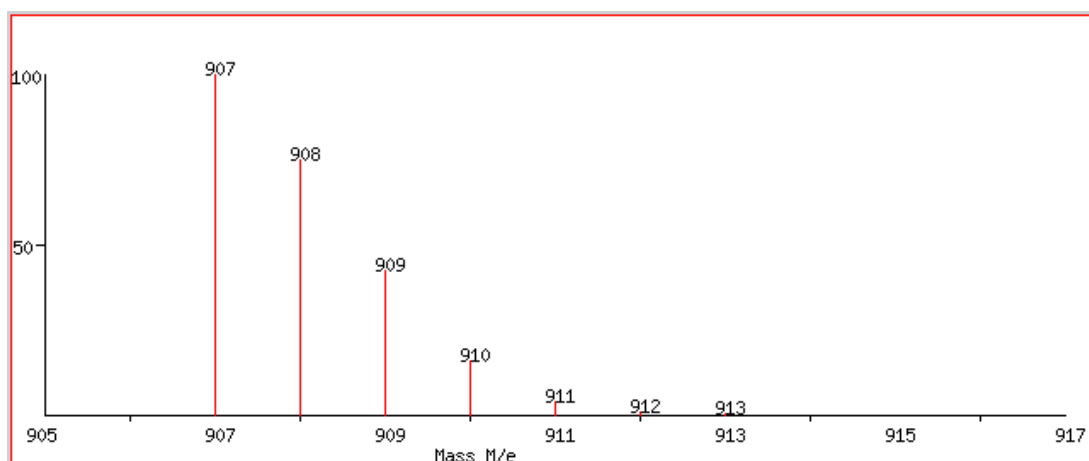


Obrázek 38. Porovnání spekter chlorofylu *a* a *b* v pozitivním/negativním módu připravených podle postupu měření II.

V měřené oblasti, která je pro charakterizaci chlorofylu nejdůležitější, se vyskytla hodnota 881,5 m/z . Není známo barvivo, ke kterému by se tato hodnota hmotnosti mohla přiřadit. Je možné, že ve vzorku byly neznámé nečistoty, které se pak ve spektru objevily.

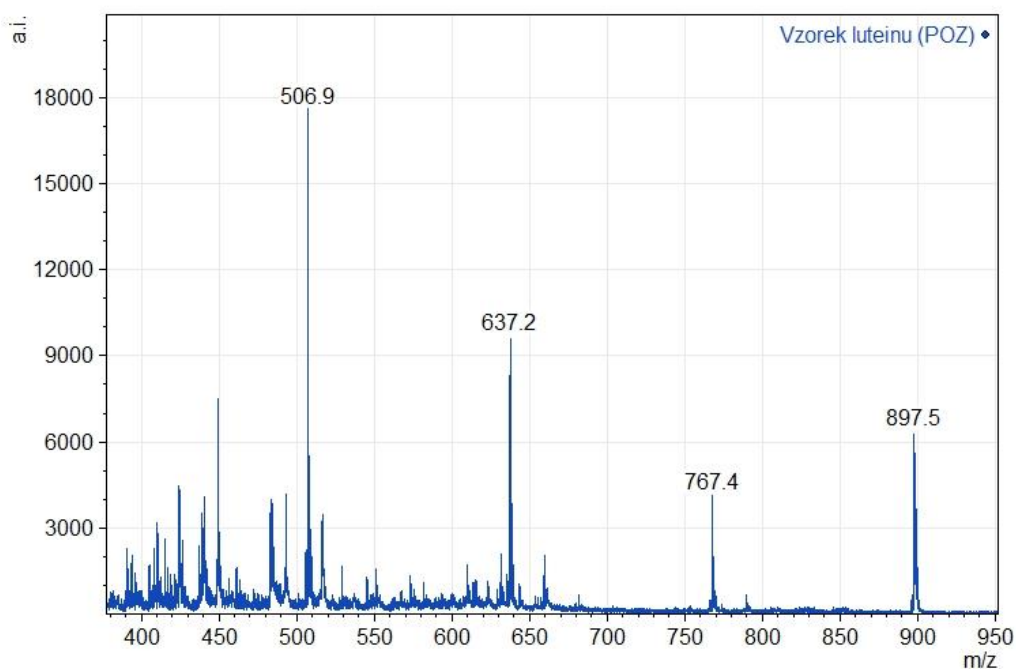


Obrázek 39. Izotopová distribuce v chlorofylu *a*.



Obrázek 40. Izotopová distribuce v chlorofylu *b*.

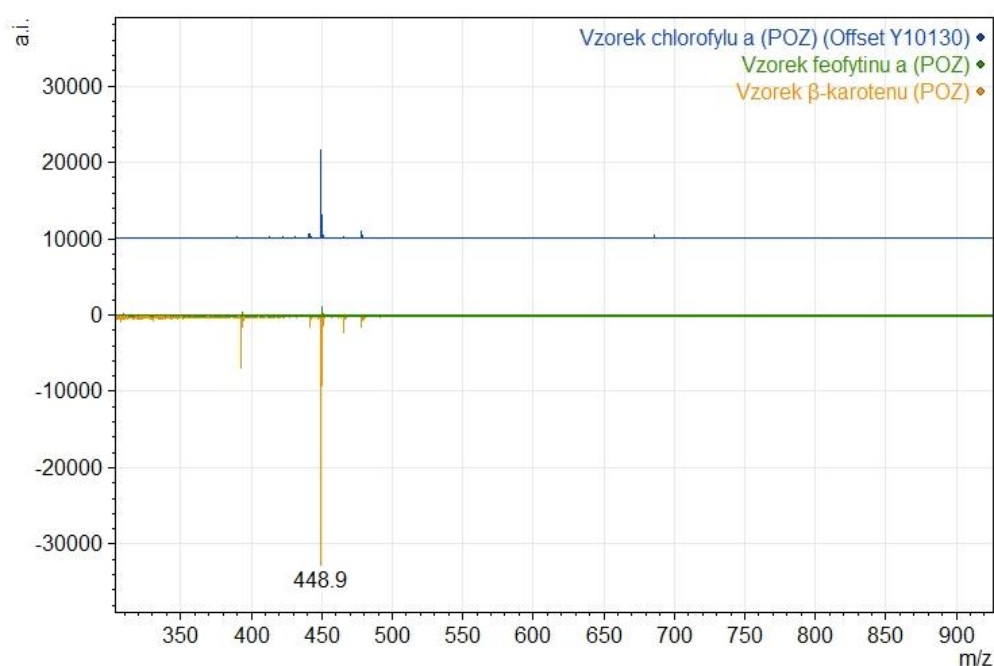
Ve spektru na obr. 41 jsou vyznačeny hodnoty 506,9; 637,2; 767,4 a 897,5 m/z , které ale nemůžeme přiřadit k žádnému barvivu. I přesto, že se hodnota 897,5 m/z nachází v intervalu mezi molárními hmotnostmi chlorofylu *a* ($M_r = 893,5$) a chlorofylu *b* ($M_r = 907,5$), nelze určit, které barvivo je zde přítomno.



Obrázek 41. Hmotnostní spektrum vzorku luteinu v pozitivním módu připraveného podle postupu měření II.

4.3.3 Měření III

Tímto způsobem měření se nepodařilo získat kvalitní spektra. Výsledky nebyly průkazné, ojediněle se vyskytovaly hodnoty velmi podobné hodnotám získaným u stacionární fáze s destilovanou vodou (přibližně 448–450 m/z) (obr. 42). Pro nepříznivé výsledky nebylo v této metodě dále pokračováno, změřily se jen vzorky chlorofyl *a*, feofytin *a* a β -karoten.

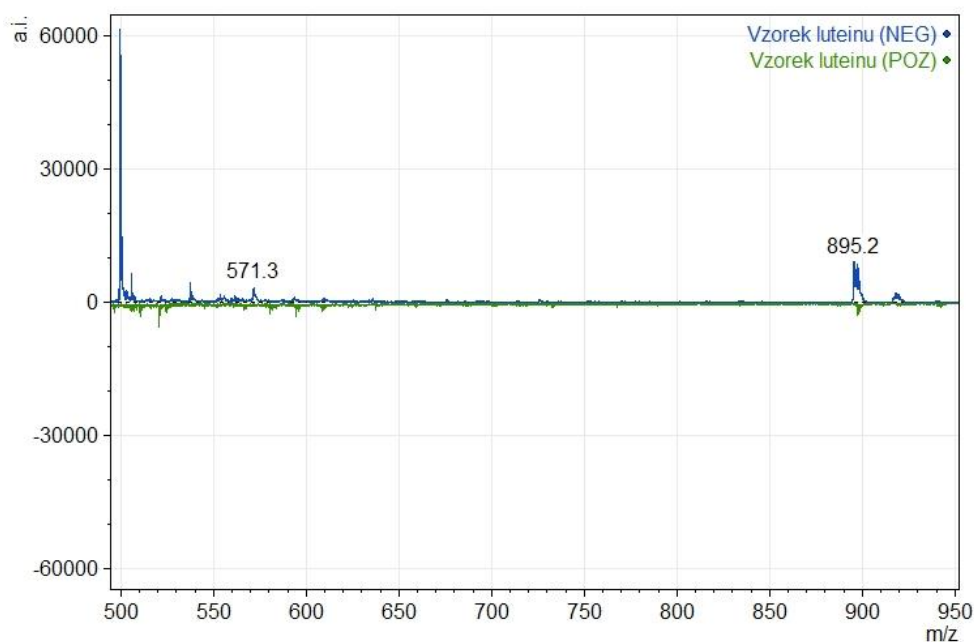


Obrázek 42. Hmotnostní spektrum vzorku chlorofylu *a*, feofytinu *a* a β -karotenu naměřených v pozitivním módu připravených podle postupu měření III.

4.3.4 Měření IV

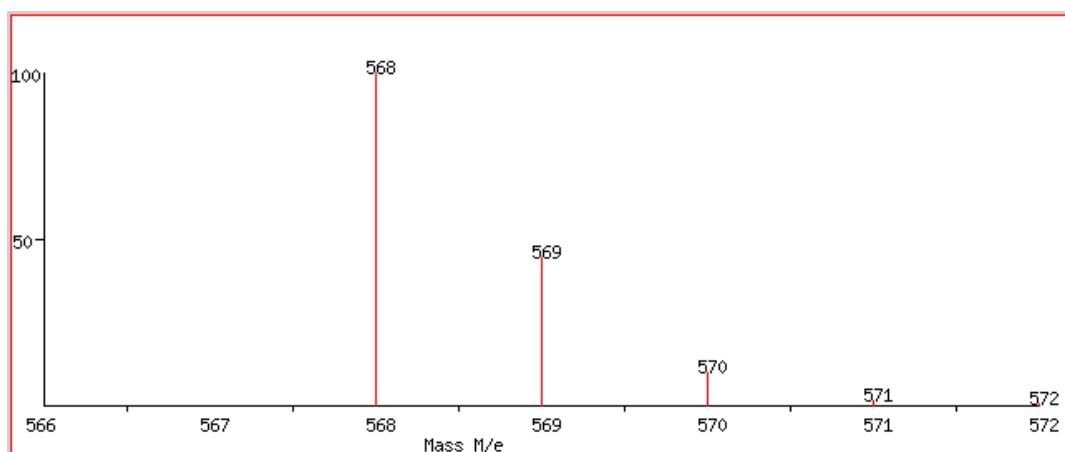
Měření se uskutečnilo dvakrát s odseparovanými vzorky na různých tenkých vrstvách v rozmezí 14 dní. První část měření se uskutečnila ve stejný den jako měření III, a proto se mohly snadněji porovnat jejich výsledky.

Během první části měření bylo získáno spektrum luteinu (obr. 43).



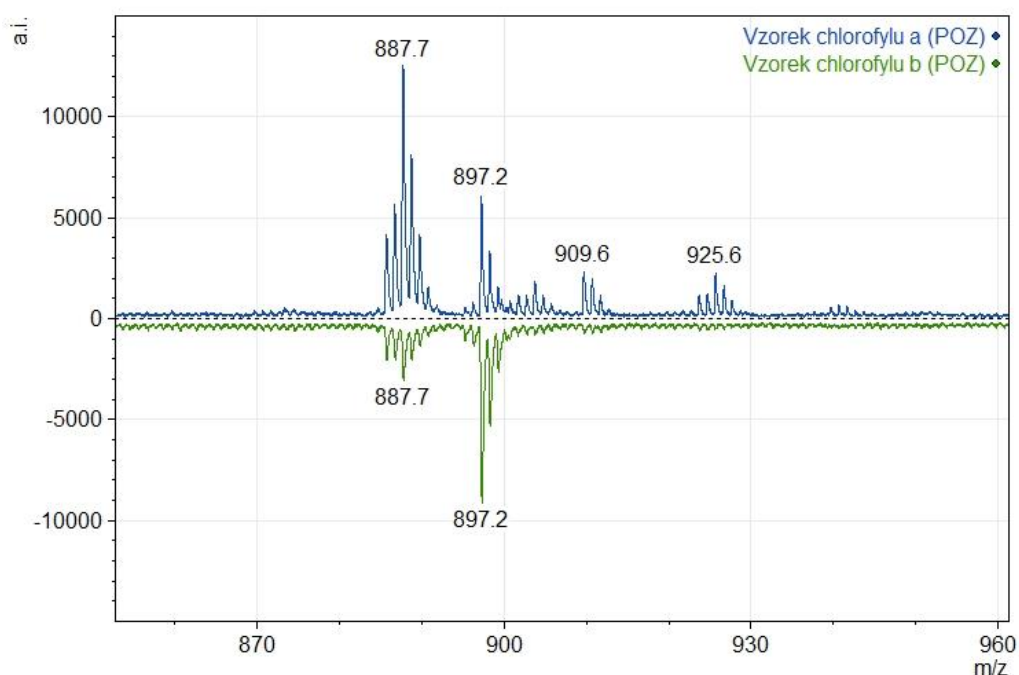
Obrázek 43. Hmotnostní spektrum vzorku luteinu v pozitivním/negativním módu připraveného podle postupu měření IV.

Ve spektru vzorku luteinu získaném v negativním módu je zvýrazněna hodnota 571,3 m/z . Ta by mohla přímo odpovídat relativní molekulové hmotnosti luteinu ($M_r = 569,4$), ale jen za předpokladu, že by byla nalezena ve spektru získaném v pozitivním módu. Izotopové distribuce v luteinu (nenabitě molekuly) je na obr. 44. Hodnota 895,2 m/z nalezená opět v negativním módu by mohla představovat hmotnost chlorofylu *a* ($M_r = 893,5$). Příčinou, proč se nejspíš ve vzorku luteinu vyskytuje i chlorofyl *a*, je možná chyba při přípravě jednotlivých vzorků, či pozůstatek tohoto barviva na místě luteinu během vyvíjení na tenké vrstvě.



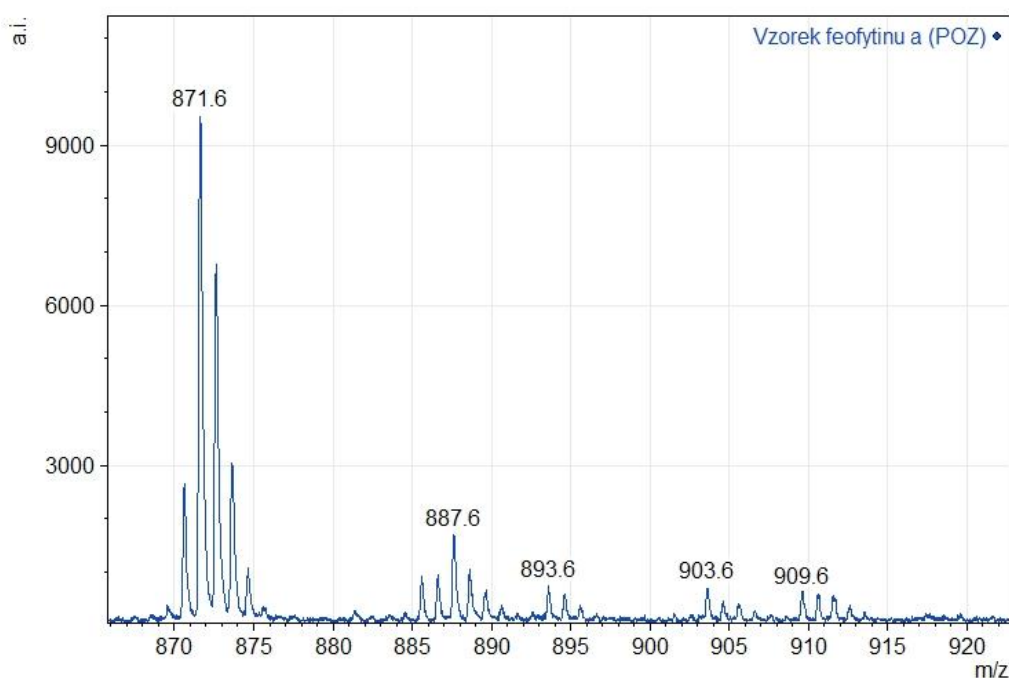
Obrázek 44. Izotopová distribuce v luteinu.

Na obr. 45 je možné vidět spektra chlorofylu *a* a *b* v pozitivním módu, která si jsou velmi podobná. U obou se vyskytují hodnoty $887,7 \text{ m/z}$ a $897,2 \text{ m/z}$. Poloviční vzdálenost těchto bodů přibližně udává relativní molekulovou hmotnost chlorofylu *a* ($M_r = 893,5$). Jestli ovšem tyto hodnoty nějakým způsobem souvisí s chlorofylem *a* není známo. Avšak ve spektru chlorofylu *a* získaném v pozitivním módu v hodnotě $909,6 \text{ m/z}$ by mohl být přítomen chlorofyl *b* ($M_r = 907,5$). Potvrzuje to izotopová distribuce v chlorofylu *b* (obr. 40) a také to, že spektrum naměřené v pozitivním módu má hodnoty o 1 vyšší než M_r . Původ hodnoty $925,6 \text{ m/z}$ je neznámý.

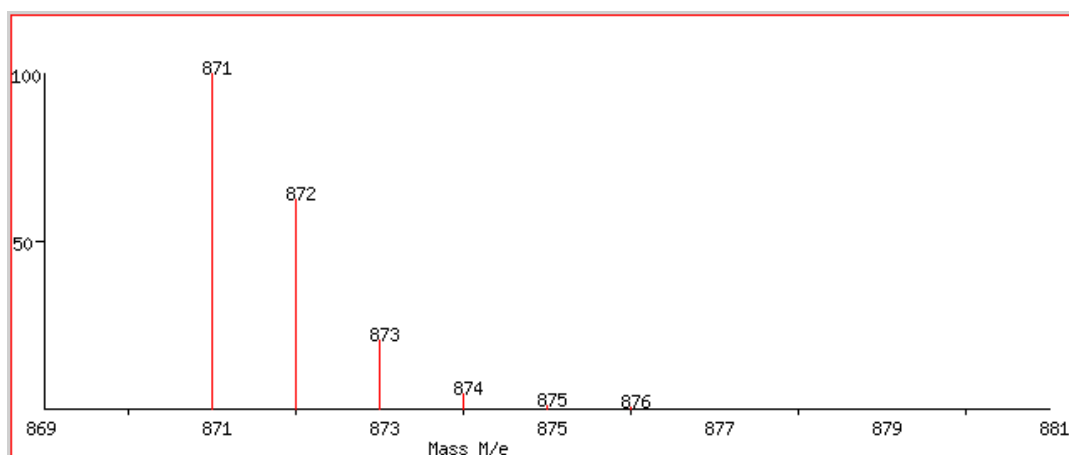


Obrázek 45. Hmotnostní spektra vzorků chlorofylu *a* a *b* naměřených v pozitivním módu připravených podle postupu měření IV.

U následujícího hmotnostního spektra feofytinu *a* bylo zaznamenáno mnoho důležitých hodnot m/z potvrzujících přítomnost této látky (obr. 46). V pozitivním spektru v hodnotě $871,6 \text{ } m/z$ by mohl být přítomen právě feofytin *a* ($M_r = 871,6$). Jeho izotopová distribuce je zobrazena na obr. 47. Nicméně v hodnotách $887,6 \text{ } m/z$ a $903,6 \text{ } m/z$ není jasné, o které molekuly by se mohlo jednat. Hodnota $893,6 \text{ } m/z$ by mohla odpovídat chlorofylu *a* ($M_r = 893,5$). Hodnota $909,6 \text{ } m/z$ se shoduje s hodnotou v předchozím spektru (ve vzorku chlorofylu *a* naměřeného v pozitivním módu), a proto by to mohl být opět chlorofyl *b* ($M_r = 907,5$). Důvodem, proč se ve vzorku feofytinu *a* zobrazila i jiná barviva, může být špatná izolace barviv, či pochybení při odebírání a přípravě vzorku.

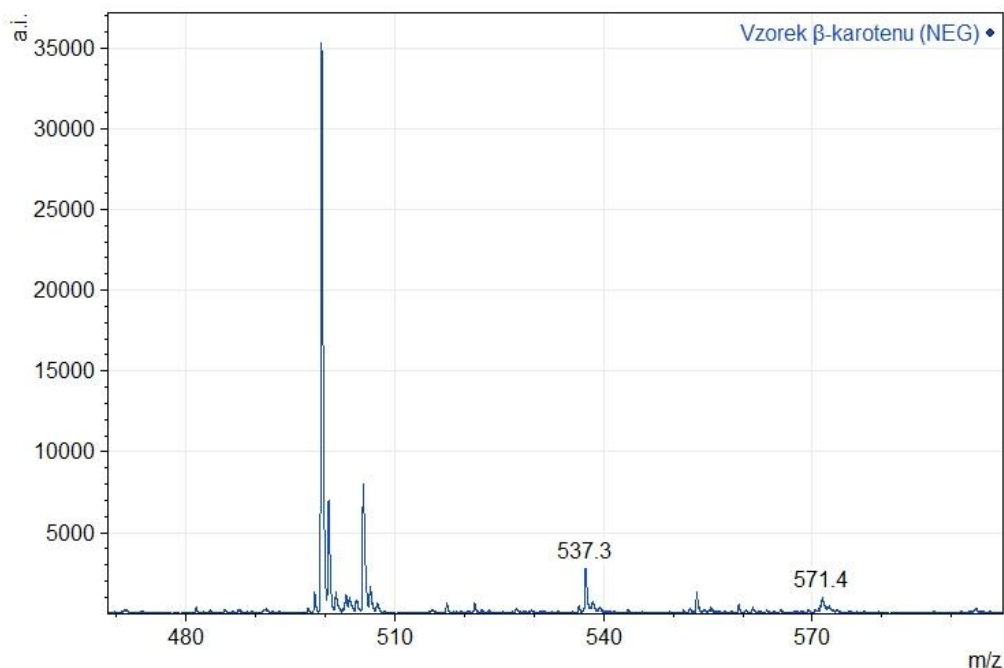


Obrázek 46. Hmotnostní spektrum vzorku feofytinu *a* naměřeného v pozitivním módu připraveného podle postupu měření IV.

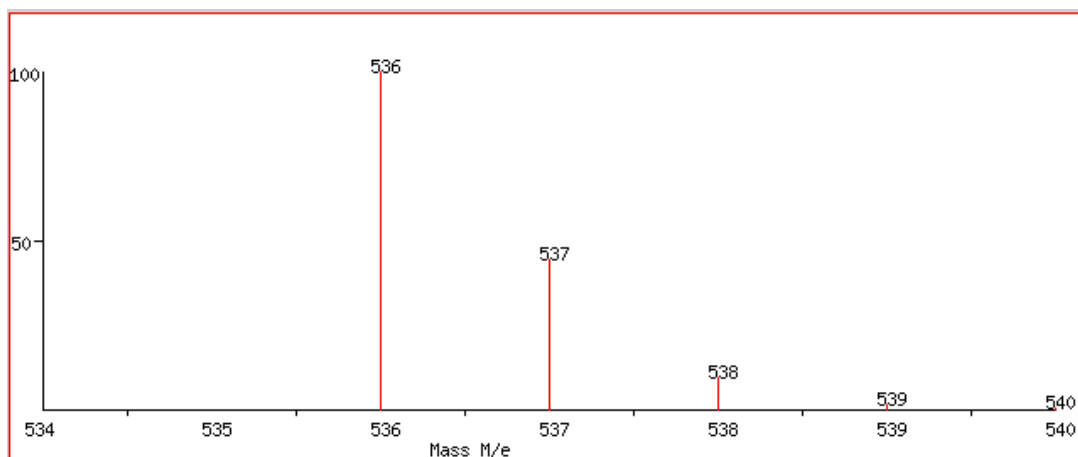


Obrázek 47. Izotopová distribuce ve feofytinu *a*.

Posledním hmotnostním spektrem z první části měření IV, které je významné, je β -karoten (obr. 48). Hodnota $537,3 \text{ m/z}$ získaná při měření v negativním módu by mohla odpovídat β -karotenu ($M_r = 537,4$). Izotopová distribuce β -karotenu je uvedena na obr. 49. Hodnota $571,4 \text{ m/z}$ by mohla vzdáleně odpovídat luteinu ($M_r = 569,4$), nicméně za předpokladu, že by spektrum bylo naměřeno v pozitivním módu.



Obrázek 48. Hmotnostní spektrum vzorku β -karotenu naměřeného v negativním módu připraveného podle postupu měření IV.



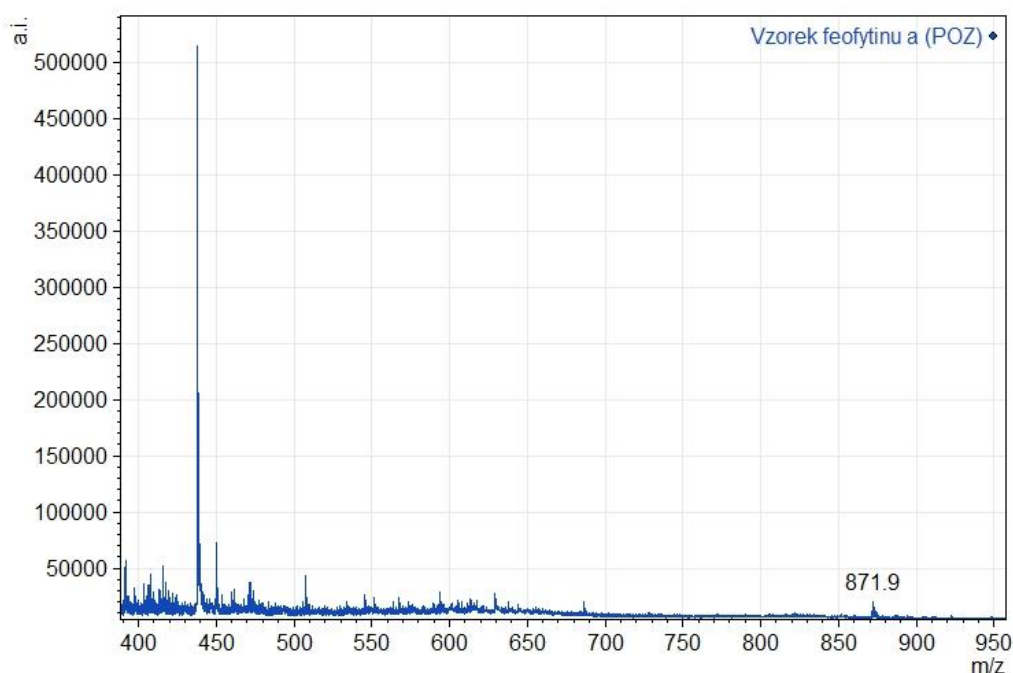
Obrázek 49. Izotopová distribuce v β -karotenu.

Pro druhou část měření se nově odseparovala jednotlivá barviva z extraktu jetele lučního (*Trifolium pratense*). Zároveň byla vyzkoušena izolace barviva z barevných listů javoru mléče (*Acer platanoides*), avšak naměřené hodnoty nebyly pro měření relevantní, protože se odseparovala pouze stejná barviva jako u zelených listů jetele lučního (*Trifolium pratense*). Tímto posledním měřením byla snaha docílit nejlepšího

výsledku, a proto se vyvíjení TLC extraktu jetele lučního (*Trifolium pratense*) ponechalo nejen na celou dobu, ale i na zkrácenou dobu vyvíjení, kdy se odseparovala jen určitá barviva, která byla ještě více sytá a zkoncentrovaná na tenké vrstvě.

Úplně odseparovaná barviva na tenké vrstvě

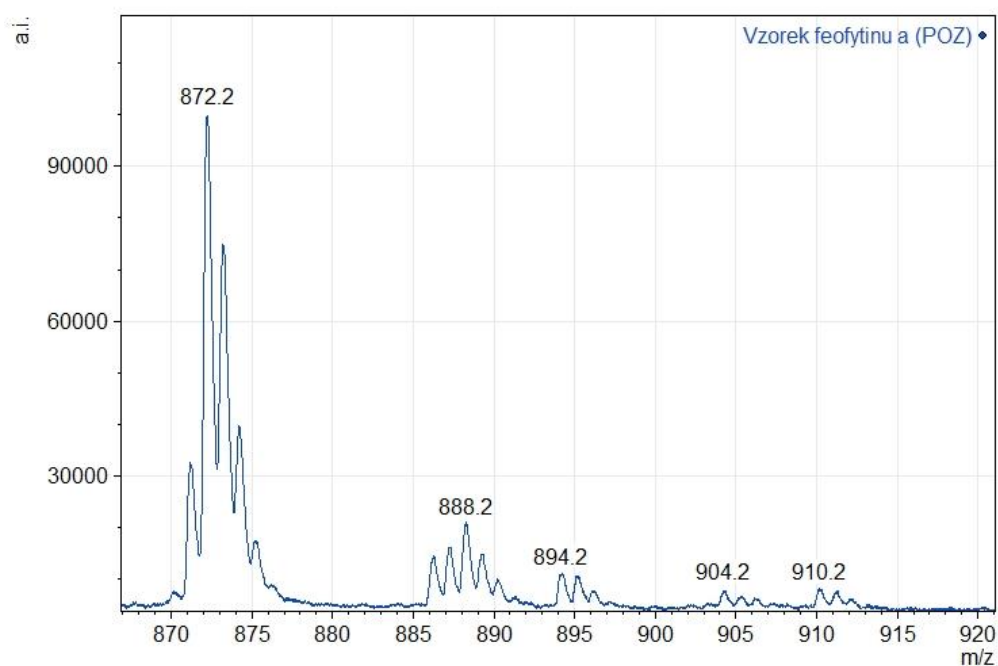
Ve spektru získaném měřením v pozitivním módu byla v hodnotě 871,9 m/z (obr. 50) znovu potvrzena přítomnost feofytinu *a* ($M_r = 871,6$).



Obrázek 50. Hmotnostní spektrum vzorku feofytinu *a* naměřené v pozitivním módu připraveného podle postupu měření IV.

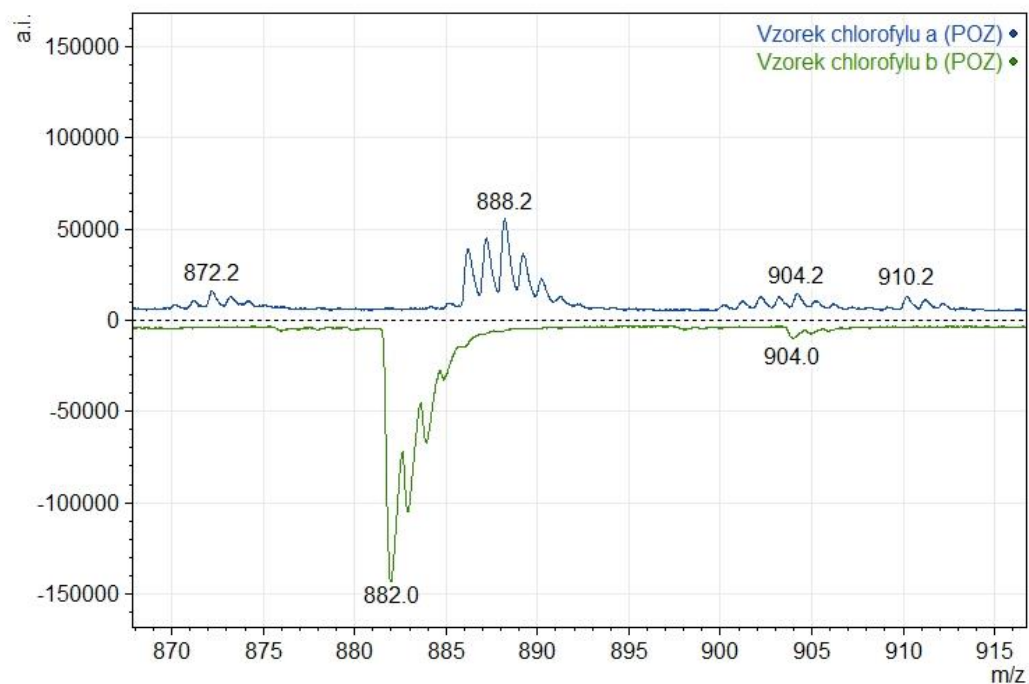
Nedokonale odseparovaná barviva

Spektrum na obr. 51 (získané v pozitivním módu z místa tenké vrstvy, kde měl být přítomen feofytin *a*) udává několik hodnot: 872,2; 888,2; 894,2; 904,2 a 910,2 m/z . Musíme brát v potaz, že spektrum je naměřené v pozitivním módu (proto hodnoty jsou o 1 vyšší než M_r). V hodnotě 872,2 m/z by mohl být přítomen feofytin *a* ($M_r = 871,6$). O hodnotách 888,2 m/z a 904,2 m/z není známo, která barviva by to mohla být. Hodnota 894,2 m/z by mohla odpovídat chlorofylu *a* ($M_r = 893,5$), hodnota 910,2 m/z by mohla vzdáleně odpovídat chlorofylu *b* ($M_r = 907,5$).



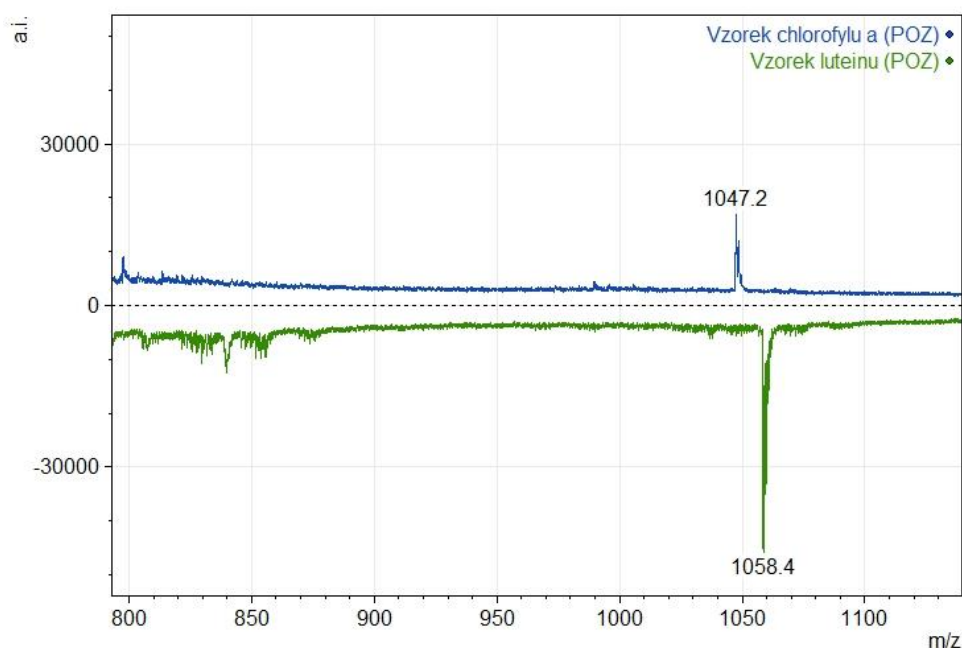
Obrázek 51. Hmotnostní spektrum vzorku feofytinu *a* naměřené v pozitivním módu připraveného podle postupu měření IV.

Podobné hodnoty se naměřely u vzorků chlorofylu *a* a *b* (obr. 52). Pro stejné hodnoty (nebo odlišné jen v desetinném čísle) jako u vzorku feofytinu *a* platí to stejné přiřazení k určitým barvivům. Ačkoli u vzorku chlorofylu *b* byla naměřena i hodnota 882,0 *m/z*, ke které není známo příslušné barvivo.



Obrázek 52. Hmotnostní spektra vzorků chlorofylu *a* a *b* naměřené v pozitivním módu připravených podle postupu měření IV.

Za zmínku stojí i některá naměřená spektra z tenké vrstvy z extraktu javoru mléče (*Acer platanoides*) (obr. 53). Ve vzorku chlorofylu *a* (z místa pravděpodobného výskytu na tenké vrstvě dle literatury [54, 55]) získaném v pozitivním módu, byla zjištěna hodnota 1047,2 m/z a ve vzorku luteinu hodnota 1058,4 m/z . Tyto hodnoty jsou velmi vysoké, a nelze u nich s jistotou určit jejich původ.



Obrázek 53. Vybraná hmotnostní spektra vzorků chlorofylu *a* a luteinu naměřená v pozitivním módu připravených podle postupu měření IV, která byla získána z extraktu javoru mléče (*Acer platanoides*).

V tabulce IV jsou uvedena barviva, která byla očekávána v zelených listech jetele lučního (*Trifolium pratense*) s jejich relativní molekulovou hmotností a způsoby měření, kterými byly identifikovány. Jako nejúspěšnější postup pro hmotnostní charakterizaci rostlinných barviv se jeví metoda použitá pro měření IV s využitím pozitivního módu.

Tabulka IV. Shrnutí hmotnostní charakterizace listových barviv jetele lučního (*Trifolium pratense*) metodou MALDI-TOF MS rozdělené na jednotlivá měření uskutečněná v pozitivním (POZ) a negativním (NEG) módu; - neúspěšné měření, + úspěšné měření.

Barvivo	Relativní molekulová hmotnost M_r	Měření I		Měření II		Měření III		Měření IV	
		POZ	NEG	POZ	NEG	POZ	NEG	POZ	NEG
β -karoten	537,4	-	-	-	-	-	-	-	+
feofytin <i>a</i>	871,6	-	-	-	-	-	-	+	-
chlorofyl <i>a</i>	893,5	-	-	-	-	-	-	+	-
chlorofyl <i>b</i>	907,5	-	-	-	-	-	-	+	-
lutein	569,4	-	-	-	-	-	-	-	-
violaxanthin (neoxanthin)	601,4	+	-	-	-	-	-	-	-

5 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo izolovat rostlinná barviva z listů jetele lučního (*Trifolium pratense*) metodou TLC a pokusit se o jejich hmotnostní charakterizaci metodou MALDI-TOF. Pro zajímavost byla vyzkoušena i metoda infračervené spektroskopie FTIR a separace listových barviv z barevných listů javoru mléče (*Acer platanoides*).

Separace listových barviv metodou TLC byla poměrně jednoduchá a časově nenáročná. Před každou hmotnostní charakterizací se odseparoval nově vytvořený extrakt a vytvořila se tak nová tenká vrstva Silufolu. Kvůli možnosti vytvoření většího množství tenkých vrstev se mohlo uskutečnit několik měření metodou hmotnostní spektrometrie. Pro separaci barviv z listů javoru mléče (*Acer platanoides*) by bylo vhodné použít jinou mobilní fázi (eluční směs), která by mohla rozpustit a odseparovat i ostatní barviva.

Izolovaná listová barviva na tenké vrstvě se dále zkoumala metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF a infračervenou spektroskopií FTIR.

Charakterizace chlorofylu *a* metodou infračervené spektroskopie FTIR nebyla úspěšná. Výsledná absorpční spektra chlorofylu *a* a stacionární fáze byla porovnána a bylo shledáno, že jsou totožná. Tudiž tato metoda nebyla shledána vhodnou pro charakterizaci rostlinných barviv obsažených v zelených částech rostlin.

Další testovanou metodou byla hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Pro tuto metodu byla nejprve jednotlivá barviva z tenké vrstvy jen seškrábána a rozpuštěna v destilované vodě. Tímto postupem přípravy vzorku se určilo barvivo violaxanthin nebo neoxanthin. Pro nedostatek informací nebylo možné s jistotou určit, které z nich by to mohlo být, neboť mají stejné molekulové hmotnosti. Dalším měřením bylo zjištěno, že tento postup přípravy vzorku není příliš vhodný pro hmotnostní charakterizaci barviv. Postup využívající přidání matrice (DHB) k jednotlivým barvivům separovaným na tenké vrstvě byl už pro měření nadějnější, avšak žádné barvivo se tímto postupem nepodařilo určit přímo. Dalším způsobem měření bylo rozpustit barevné skvrny (po jejich seškrábání) z tenké vrstvy přímo v mobilní fázi, která byla využita v metodě TLC. Barevné roztoky pak byly změřeny, ale měření nebylo úspěšné (ze spekter nebylo možné nic odvodit). Kvůli předcházejícím měřením

bylo zřejmé, že bez přídavku matrice není možná hmotnostní charakterizace jednotlivých barviv. A tak byl pro poslední způsob měření využit postup, kdy byly smíchány roztoky rozpuštěných barviv v mobilní fázi s matricí. Hmotnostní spektra, která byla naměřena z těchto vzorků, byla nejkvalitnější. Podařilo se charakterizovat barviva β -karoten, feofytin *a*, chlorofyl *a* a chlorofyl *b*. Podle výše zmíněných spekter je možné pozorovat, že i když se jednalo o spektrum určitého barviva (určeného dle literatury [54, 55]), tak se v něm většinou vyskytovala i ostatní barviva. Mohlo to být zapříčiněno nedokonalou separací barviv či nechtěným seškrábnutím i jiného barviva z tenké vrstvy. Barviva lutein, chlorofyl *b* a chlorofyl *a* byla při separaci na tenké vrstvě velmi blízko sebe, proto bylo možné předpokládat, že budou s velkou pravděpodobností identifikována ve vzorcích u sebe navzájem. Mimo jiné byly naměřeny i hodnoty, které nebylo možno určit a přiřadit k některému konkrétnímu barvivu. Pro zajímavost byla zmíněna i spektra vybraných barviv javoru mléče (*Acer platanoides*), u kterých byly naměřeny nezvykle vysoké hodnoty m/z . Původ těchto hodnot nebyl zjištěn. Na závěr je možné konstatovat, že metodou MALDI-TOF se podařilo zjistit alespoň některá listová barviva s velkou přesností.

6 Seznam použitých informačních zdrojů

1. CAMPBELL, N.A. a J.B. REECE. *Biologie*. Brno: Computer Press, 2008. 1332 s. ISBN 80-251-1178-4.
2. MCMURRY, J. *Organická chemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2007. 1270 s. ISBN 978-80-7080-637-1.
3. HALL, D.O. a K.K. RAO. *Photosynthesis* 5. vyd. Cambridge: University Press, 1994. 211 s. ISBN 0-521-43622-2.
4. JONES, R., H. OUGHAM, H. THOMAS a S. WAALAND. *The Molecular Life of Plants*. Chichester: Wiley-Blackwell, 2013. 742 s. ISBN 978-0-470-87012-9.
5. BORODKIN, V.F. *Chemie organických barviv*. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1987. 368 s. ISBN DT 667.27/.28:54.
6. KODÍČEK, M. *Biochemické pojmy - výkladový slovník*. Praha: VŠCHT Praha, 2004, 171 s. ISBN 80-7080-551-X.
7. MARQUEZ, U.M.L. a D. BARRMANN. Chlorophylls V T. BECHTOLD a R. MUSSAK ed. *Handbook of Natural Colorants*. Chichester: John Wiley & Sons, 2009, s. 243-254. ISBN 978-0-470-51199-2.
8. LAWLOR, D.W. *Photosynthesis*. 3. vyd. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2001. 386 s. ISBN 1-85996-157-6.
9. JACKSON, A.H. Structure, Properties and Distribution of Chlorophylls. V T.W. GOODWIN ed. *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. London: ACADEMIC PRESS INC., 1976, roč. 1, s. 1-63. ISBN 0-12-289901-6.
10. ALBERTS, B., D. BRAY, A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS a P. WALTER. *Základy buněčné biologie - Úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 1998. 630 s. ISBN 80-902906-2-0.
11. MALKIN, R. a K. NIYOGI. Photosynthesis. V B.B. BUCHANAN, W. GRUISSEM a R.L. JONES ed. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiologists, 2000, s. 568-629. ISBN 0-943088-39-9.
12. KOOLMAN, J. a K.-H. ROEHM. *Color Atlas of Biochemistry*. 2. vyd. Stuttgart: Thieme, 2005. 467 s. ISBN 1-58890-247-1.
13. VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. Praha: ACADEMIA, 2002. ISBN 80-200-0600-1.
14. BIDWELL, R.G.S. *Plant Physiology*. New York: Macmillan Publishing Co., Inc., 1974. 643 s. ISBN 0-02-309440-0.
15. NOBELPRIZE.ORG. All Nobel Prizes in Chemistry [online]. *Nobel Media AB*. 2014. [cit. 2015-03-15]. Dostupné z: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/.
16. BLANKENSHIP, R.E. *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2002. 321 s. ISBN 978-0-632-04321-7.
17. SOFROVÁ, D., M. TICHÁ, J. BARTHOVÁ, G. ENTLICHER, M. STIBOROVÁ, F. NOVÁK, J. HUDEČEK, J. HLADÍK, A. KRAJHANZL a V. MARTÍNEK. *Biochemie - Základní kurz*. Praha: Karolinum, 2009. 229 s. ISBN 978-80-246-1678-0.
18. KRASNOVSKY JR, A. Chlorophyll isolation, structure and function: major landmarks of the early history of research in the Russian Empire and the Soviet Union [online]. *Photosynthesis Research*. 2003. roč. 76, č. 1-3, s. 389-403.

- [cit. 2015-02-25]. ISSN 0166-8595. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1023/A%3A1024934317155>.
19. YACOBI, Y.Z. From Tswett to identified flying objects: A concise history of chlorophyll a use for quantification of phytoplankton [online]. *Israel Journal of Plant Sciences*. 2012. roč. 60, č. 1/2, s. 243-251. [cit. 2015-03-05]. ISSN 07929978. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=84461566&lang=cs&site=ehost-live>.
 20. STRAIN, H.H. Pigments of algae. V G.M. SMITH ed. *Manual of Phycology*. 1951, s. 243-262.
 21. CHEN, M., M. SCHLIEB, R.D. WILLOWS, Z.-L. CAI, B.A. NEILAN a H. SCHEER. A Red-Shifted Chlorophyll [online]. *Science*. 2010. roč. 329, s. 1318-1319. [cit. 2015-02-25]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/content/329/5997/1318.full>.
 22. RAO, A.V. a L.G. RAO. Carotenoids and human health [online]. *Pharmacological Research*. 2007. roč. 55, č. 3, s. 207-216. [cit. 2015-03-15]. ISSN 1043-6618. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661807000357>.
 23. CHANDRIKA, U.G. Carotenoid Dyes - Properties. V T. BECHTOLD a R. MUSSAK ed. *Handbook of Natural Colorants*. Chichester: John Wiley & Sons, 2009, s. 221-236. ISBN 978-0-470-51199-2.
 24. KINDL, H. a B. WÖBER. *Biochemie rostlin*. Praha: Academia, 1981. 392 s.
 25. PYKE, K. *Plastid Biology*. New York: Cambridge University Press, 2009. 203 s. ISBN 978-0-521-71197-5.
 26. BRAMLEY, P.M. Is lycopene beneficial to human health? [online]. *Phytochemistry*. 2000. roč. 54, č. 3, s. 233-236. [cit. 2015-03-23]. ISSN 0031-9422. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942200001035>.
 27. STENESH, J. *Dictionary of biochemistry and molecular biology*. 2. vyd. Chichester: John Wiley & Sons, 1989. 536 s. ISBN 978-0-471-84089-3.
 28. ALVES-RODRIGUES, A. a A. SHAO. The science behind lutein [online]. *Toxicology Letters*. 2004. roč. 150, č. 1, s. 57-83. [cit. 2015-03-23]. ISSN 0378-4274. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427404000396>.
 29. SCHWEPPE, H. *Handbuch der Naturfarbstoffe: Vorkommen, Verwendung, Nachweis*. Landsberg am Lech: Ecomed, 1993. 800 s. ISBN 3-609-65130-X.
 30. OPEKAR, F., I. JELÍNEK, P. RYCHLOVSKÝ a Z. PLZÁK. *Základní analytická chemie*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2010. 203 s. ISBN 978-80-246-1775-6.
 31. VOLKA, K., J. FOGL, M. POPL a M. SUCHÁNEK. *Analytická chemie II*. Praha: VŠCHT Praha, 1995. 236 s. ISBN 80-7080-227-8.
 32. ZÝKA, J. a KOLEKTIV. *Analytická příručka : I. díl*. 4. upr. vyd. Praha: SNTL/ALFA, 1988. 680 s. ISBN DT 543(021).
 33. KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Klouda Pavel, 2003. 132 s. ISBN 978-80-86369-07-5.
 34. MALLET, A.I. a S. DOWN. Dictionary of Mass Spectrometry [online]. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. [cit. 2015-03-08]. ISBN 978-0-470-02761-5. Dostupné z: <http://site.ebrary.com/lib/cuni/reader.action?docID=10395531>.

35. IZMAILOV, N.A. a M.S. SCHRAIBER. *Farmatsiya (Moscow)*. 1938, roč., č. 3, s. 1.
36. SHOSTENKO, Y.V., V.P. GEORGIEVSKII a M.G. LEVIN. History of the discovery of thinlayer chromatography [online]. *Journal of Analytical Chemistry*. 2000. roč. 55, č. 9, s. 904-905. [cit. 2015-03-25]. ISSN 1061-9348. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02757859>
37. BEREZKIN, V.G. Contributions from N.A. Izmailov and M.S. Schraiber to the development of thin-layer chromatography (On the 70th anniversary of the publication of the first paper on thin-layer chromatography) [online]. *Journal of Analytical Chemistry*. 2008. roč. 63, č. 4, s. 400-404. [cit. 2015-03-27]. ISSN 10619348. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=31600394&lang=cs&site=ehost-live>.
38. STUART, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications* [online]. Chichester: John Wiley & Sons, 2004. [cit. 2015-03-25]. ISBN 978-0-470-01113-3. Dostupné z: <http://site.ebrary.com/lib/cuni/detail.action?docID=10113963>.
39. SMITH, B.C. *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. 2. vyd. Boca Raton: CRC Press, 2011. ISBN 978-1-4200-6929-7.
40. HOLLAS, J.M. *Modern Spectroscopy*. 4. vyd. Chichester: John Wiley & Sons, 2004. 452 s. ISBN 0-470-84416-7.
41. ZÝKA, J. a KOLEKTIV. *Analytická příručka : II. díl*. 4. upr. vyd. Praha: SNTL/ALFA, 1988. 832 s. ISBN DT 543(021).
42. GRIFFITHS, P.R. a J.A. DE HASETH. *Fourier Transform Infrared Spectrometry* [online]. 2. vyd. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007. [cit. 2015-03-25]. ISBN 978-0-471-19404-0. Dostupné z: http://books.google.cz/books?id=C_c0GVe8MX0C&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false.
43. KOENIG, J.L. Fourier transform infrared spectroscopy of chemical systems [online]. *Accounts of Chemical Research*. 1981. roč. 14, č. 6, s. 171-178. [cit. 2015-03-26]. ISSN 0001-4842. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1021/ar00066a002>.
44. CHAPMAN, J.R. Mass Spectrometry. V R. RAPLEY a J.M. WALKER ed. *Molecular Biomethods Handbook*. New Jersey: Humana Press, 1998, s. 669-696. ISBN 0-89603-501-8.
45. NOBELPRIZE.ORG. All Nobel Prizes in Physics [online]. *Nobel Media AB*. 2014. [cit. 2015-03-25]. Dostupné z: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/.
46. DE HOFFMANN, E. a V. STROOBANT. *Mass spectrometry : principles and applications*. 3. vyd. Chichester: John Wiley & Sons, 2007. 489 s. ISBN 978-0-470-03311-1.
47. ASTON, F.W. Nobel Lecture: Mass Spectra and Isotopes [online]. *Nobel Lectures, Chemistry 1922-1941*. 1922. [cit. 2015-03-26]. Dostupné z: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1922/aston-lecture.pdf.
48. GRIFFITHS, J. A Brief History of Mass Spectrometry [online]. *Analytical Chemistry*. 2008. roč. 80, č. 15, s. 5678-5683. [cit. 2015-03-20]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1021/ac8013065>.

49. PASCH, H. a R. GHAHARY. Analysis of complex polymers by MALDI-TOF mass spectrometry [online]. *Macromolecular Symposia*. 2000. roč. 152, č. 1, s. 267-278. [cit. 2015-03-28]. ISSN 1521-3900. Dostupné z: [http://dx.doi.org/10.1002/1521-3900\(200003\)152:1<267::AID-MASY267>3.0.CO;2-N](http://dx.doi.org/10.1002/1521-3900(200003)152:1<267::AID-MASY267>3.0.CO;2-N).
50. COOPER, A. *Biophysical Chemistry*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2004. 184 s. ISBN 0-85404-480-9.
51. DOUBRAVA, J., J. KOŠTÍŘ a J. POSPÍŠIL. *Základy biochemie*. 1. vyd. Praha: SPN, 1984. 272 s.
52. MÜLLEROVÁ, L., S. NIKOLOVOVÁ, T. ODCHÁZELOVÁ a D. POLANKOVÁ. Extrakce listových barviv aceton. V *Chemické metody studia biologických materiálů*.
53. MÜLLEROVÁ, L., S. NIKOLOVOVÁ, T. ODCHÁZELOVÁ a D. POLANKOVÁ. Dělení listových barviv na tenké vrstvě Silufol. V *Chemické metody studia biologických materiálů*.
54. RICHTR, V. a M. KRAITR. Tenkovrstvá chromatografie ve výuce chemie (Příloha III) [online]. *Chemie XX*. 2004. s. 57-71. [cit. 2015-04-02]. Dostupné z: https://fpe.zcu.cz/kch/dokumenty/Priloha_III.pdf.
55. INTERAKTIVNI-CHEMIE.CZ. Laboratorní práce č.7: Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) [online]. *Interaktivní laboratoř chemie*. 2015. [cit. 2015-04-02]. Dostupné z: <http://interaktivni-chemie.cz/wp-content/uploads/7-TLC.pdf>.

7 Seznam použitých zkratk

ACN	acetonitril
ATP	adenosintrifosfát
CAM	crassulacean acid metabolism – metabolismus sukulentů
CC	Column Chromatography – sloupcová chromatografie
CI	Chemical Ionization – chemická ionizace
DHB	2,5-dihydroxybenzoová kyselina
DTGS	deuterovaný triglycinsulfát
ESI	Electrospray Ionization – ionizace elektrosprejem
FAB	Fast Atom Bombardment – bombardování rychlými atomy
FIR	Far Infrared – Daleká infračervená oblast
FTICR	Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance – Fourierova transformace iontové cyklotronové rezonance
FTICR MS	Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry – hmotnostní spektrometrie založená na iontové cyklotronové rezonanci s Fourierovou transformací
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy – infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
G3P	glyceraldehyd-3-fosfát
GC	Gas Chromatography – plynová chromatografie
GC-MS	Gas Chromatography Mass Spectrometry – hmotnostní spektrometrie s plynovou chromatografií
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICR	Ion Cyclotron Resonance – iontová cyklotronová rezonance
IR	Infrared – infračervené záření, infračervená oblast spektra

LC	Liquid Chromatography – kapalinová chromatografie
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry – hmotnostní spektrometrie s kapalinovou chromatografií
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization – laserová desorpce/ionizace za účasti matrice
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization – Time of Flight – laserová desorpce/ionizace za účasti matrice, analýza pomocí průletového analyzátoru
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry – hmotnostní spektrometrie metodou laserové desorpce/ionizace za účasti matrice a analýzou pomocí průletového analyzátoru
MCT	Mercury-Cadmium Tellurid – rtuť-kadmium telurid
MIR	Mid-Infrared – střední infračervená oblast
MS	Mass Spectrometry – hmotnostní spektrometrie
NADPH	nikotinadenindinukleotidfosfát
NEG	negativní mód ionizace
NIR	Near Infrared – blízká infračervená oblast
NMR	Nuclear Magnetic Resonance – nukleární magnetická rezonance
PC	Paper Chromatography – papírová chromatografie
POZ	pozitivní mód ionizace
PS I	photosystem I – fotosystém I
PS II	photosystem II – fotosystém II
RuBP	ribulóza-1,5-fosfát
SFC-MS	Supercritical Fluid Chromatography Mass Spectrometry – hmotnostní spektrometrie s tekutinou v nadkritickém stavu
TFA	trifluoroctová kyselina

TLC	Thin Layer Chromatography – tenkovrstvá chromatografie
TOF	Time of Flight – průletový analyzátor
UV	Ultra Violet – ultrafialové záření, ultrafialová oblast spektra
VIS	Visible – viditelná oblast spektra, viditelné spektrum